

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur

Délivré par
Centre International d'études supérieures en sciences agronomiques
(Université de Montpellier)

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
Et de l'unité de recherche AGAP

Spécialité :
Biologie Intégrative, Diversité et Amélioration des Plantes (BIDAP)

Présentée par Tran Dinh Minh

**Le test toxinique : une méthode de
phénotypage pour l'étude de l'interaction
Hevea brasiliensis x *Corynespora cassiicola***

Dirigée par Valérie Pujade-Renaud

Soutenue le 14 Novembre 2016 devant le jury composé de :

Mme Mathilde Briard ,	Professeure, IRHS- Angers	Rapporteur
M. Michel Dron	Professeur, Université Paris -Saclay	Rapporteur
M. Jean-Marc Audergon	Directeur de recherche, INRA- Avignon	Examineur
M. Dominique Garcia	Chargé de recherche, CIRAD-Montpellier	Examineur
Mme Valérie Pujade-Renaud	Chargé de recherche, CIRAD-Montpellier	Directrice de thèse



**Le test toxinique : une méthode de
phénotypage pour l'étude de l'interaction
Hevea brasiliensis x *Corynespora cassiicola***

Tran Dinh Minh



Cette étude a été co-financée par l'IFC (Institut Français du Caoutchouc), le RRIV (Rubber Research Institute of Vietnam) et le Cirad.

Les travaux de cette étude ont été réalisés au sein des unités mixtes de recherche AGAP (Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales) au Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad) à Montpellier, PIAF (Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et Forestier) à l'Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand II, et sur les deux plantations d'hévéa des sociétés SAPH (Société Africaine de Plantations d'Hévéas) et SOGB (Société de Grand-Béréby) en Côte d'Ivoire.



Sommaires

Remerciements.....	i
Résumé	iii
Abstract	iv
Abréviations	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Introduction	1
Chapitre 1 - Présentation de l'hévéaculture et du pathosystème <i>Hevea x Corynespora</i> dans une perspective d'amélioration génétique	3
1.1 Le caoutchouc naturel et sa production par <i>Hevea brasiliensis</i>	3
1.1.1 Historique de la production du caoutchouc naturel.....	3
1.1.2 Domestication de l'hévéa	4
1.1.3 Description botanique et génétique d' <i>Hevea brasiliensis</i>	6
1.1.4 Le système laticifère et la production du caoutchouc	10
1.1.5 Les principales maladies fongiques des feuilles chez l'hévéa	15
1.1.6 Les méthodes de lutte contre les maladies fongiques.....	17
1.1.7 L'amélioration génétique de l'hévéa.....	19
1.2 La maladie « <i>Corynespora</i> Leaf Fall » (CLF)	24
1.2.1 Manifestations de la maladie dans les plantations d'hévéa.....	24
1.2.2 Symptomatologie	30
1.2.3 L'agent pathogène : <i>Corynespora cassiicola</i> (généralités)	31
1.2.4 Condition climatique et processus d'infection chez l'hévéa	32
1.2.5 Diversité génétique et pouvoir pathogène de <i>Corynespora</i>	34
1.2.6 Phytopathologie et réactions de défense chez la plante et chez l'hévéa	35
1.2.7 La cassiicoline et la diversité des effecteurs de virulence.....	39
1.2.8 Phénotypage de l'interaction <i>Hevea x Corynespora</i>	42
1.3 Objectifs de la recherche	43
Chapitre 2 - Matériel & Méthodes	45
2.1 Matériel végétal	45
2.1.1 Variétés clonales d'hévéa.....	45
2.1.2 Population F1 d'une famille biparentale	47
2.2 Matériel fongique	49
2.2.1 La collection de souches de <i>Corynespora cassiicola</i>	49
2.2.2 Méthodologie de l'isolement et de la caractérisation des souches	49
2.3 Le test toxinique	52
2.3.1 Production des filtrats de culture.....	52
2.3.2 Purification de la toxine cassiicoline Cas1 par chromatographie HPLC	52
2.3.3 Méthodologie du test toxinique.....	54
2.3.4 Liste des traitements testés	55
2.4 Test d'inoculation en gouttes conidiennes sur feuilles détachées.....	57
2.4.1 Production de la suspension de conidies	57
2.4.2 Inoculation de feuilles détachées en gouttes de suspension conidienne	57
2.5 Génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites (SSR)	58
2.6 Analyse statistique et analyse du déterminisme génétique.....	60
2.6.1 Analyses statistiques	60

2.6.2	Cartographie génétique chez l'hévéa	61
2.6.3	La détection de QTL (Quantitative Trait Locus).....	62
2.6.4	Analyse des effets alléliques parentaux de QTL.....	63
Chapitre 3 - Résultats	64	
3.1 Etude méthodologique de certains facteurs d'influence du test toxinique	64	
3.1.1	Influence du stade foliaire	65
3.1.2	Durée d'incubation	69
3.1.3	Position de la rondelle prélevée.....	71
3.1.4	Agitation des tubes en phase de macération.....	73
3.1.5	Comparaison du test toxinique et du test par inoculation conidienne.....	73
3.1.6	Bilan des résultats de la section 3.1.....	77
3.2 Application du test toxinique pour le phénotypage d'une gamme de clones	79	
3.2.1	Comparaison des critères %FE et SN (test toxinique)	81
3.2.2	Comparaison des expériences CF et CI.....	87
3.2.3	Caractérisation de la réponse des combinaisons clone x traitement au test toxinique selon le critère %FE	93
3.2.4	Bilan des résultats de la section 3.2.....	106
3.3 Cartographie génétique et détection de QTL associés aux exsudats de <i>Corynespora</i> et à des notations d'attaque de maladie en champ	107	
3.3.1	Cartographie génétique de la famille PB260 x RRIM600	107
3.3.2	Phénotypage de la famille PB260 x RRIM600	112
3.3.3	Déterminisme génétique des critères mesurés.....	122
3.3.4	Bilan des résultats de la section 3.3.....	128
3.4 Analyse de la pertinence des critères mesurés (C1, C2, %FE)	130	
3.4.1	Etude de facteurs de variation du paramètre C2.....	133
3.4.2	Test de différentes méthodes pour optimiser la mesure C2	137
3.4.3	Comparaison des critères C1 et %FE pour rendre compte de la réponse d'une gamme de clones aux traitements toxiques de <i>Corynespora cassiicola</i>	137
3.4.4	Détection de QTL pour différents critères d'évaluation	145
3.4.5	Bilan de résultats de la section 3.4	148
Chapitre 4 - Discussion, Conclusions & Perspectives.....	149	
4.1 Discussion générale	149	
4.1.1	Aspects méthodologiques du test	150
4.1.2	Sensibilité des clones d'hévéa mesurée par le test toxinique.....	154
4.1.3	Le test toxinique permet-il d'identifier des pathotypes de <i>Corynespora</i> ? ...	158
4.1.4	Déterminisme génétique de la réponse de l'hévéa aux exsudats de <i>Corynespora</i>	162
4.1.5	Effets principaux et interaction <i>Hevea</i> x <i>Corynespora</i>	167
4.2 Conclusion.....	170	
4.3 Perspectives.....	171	
Références bibliographiques	174	
Annexe	185	
Annexe 1: Protocole de l'isolement à partir des feuilles	185	
Annexe 2: Purification de la toxine cassiicoline.....	185	
Annexe 3: Poster	196	
Annexe 4: Alignement des marqueurs des groupes de liaison entre les trois cartes génétiques.....	197	
Annexe 5: Article	200	

Remerciements

Je remercie l'Institut Français du Caoutchouc, les sociétés Michelin, Siph et Socfin, et les directeurs des plantations SOGB et SAPH-Toupah en Côte d'Ivoire pour le financement et l'appui logistique apporté sur plantations, qui ont permis les recherches réalisées dans le cadre du projet IFC-Corynespora 3 et présentées dans cette thèse de doctorat.

Je voudrais remercier chaleureusement M. Phan Thanh Dung, directeur du RRV (Rubber Research Institute of Vietnam), M. Lai Van Lâm, ex-directeur, ainsi que M. Lê Mâu Tuy, chef de mon équipe, qui m'ont donné l'opportunité de poursuivre des études supérieures en France, pour leur confiance en moi et leurs encouragements constants.

Je remercie les responsables du Cirad et des unités mixtes de recherche AGAP et PIAF pour m'avoir offert un cadre de travail, les membres de mes deux comités de thèse pour leurs conseils et leurs orientations de recherche, ainsi que les rapporteurs et examinateurs du jury de cette thèse pour avoir donné de leur temps et accepté de juger mon travail.

Merci à toutes les personnes qui ont bien voulu donner de leur temps et partager avec moi des compétences scientifiques utiles pour la suite de mon activité professionnelle dans mon pays. Tout d'abord, je tiens à exprimer ma reconnaissance à André Clément-Demange, le premier chercheur Cirad que j'ai rencontré en 2007, qui a facilité le déroulement de mes études en France de 2011 à 2016. Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse, Valérie Pujade-Renaud, pour la qualité de son encadrement scientifique et l'amitié qu'elle m'a prodiguée, tout au long des trois ans de cette thèse. Merci également à Marc Seguin (directeur adjoint de l'unité AGAP et spécialiste du génotypage hévéa), Vincent Le-Guen, et Dominique Garcia pour leur accueil, leur aide et leur amitié, Anne Clément-Vidal, Frédéric de Lamotte et Frédéric Breton pour leur soutien au cours du travail de purification de la cassiicoline, Gérard Olivier pour ses conseils et la mise à disposition d'un espace de serre à Montpellier, Philippe Label pour ses conseils sur les analyses statistiques sous R ainsi que Marine Déon, préceptrice de mes travaux...

Je remercie Mouman Soumahoro, Aurélien Masson, Lino Dobbelaere et les personnes avec qui j'ai travaillé en Côte d'Ivoire et qui m'ont apporté leur soutien pendant les huit mois de mes trois missions, notamment William, Catherine, Laurent, Alassane, Blaise, Armande, Larissa, Tah Bi, et Routchetou.

Je voudrais remercier les amis et collègues en Master que j'ai eu la chance de rencontrer en France. Un grand merci tout particulier à Isabelle Clément-Demange pour son accueil dans sa famille et son aide dès mes premiers pas en France, pour les souvenirs inoubliables et la découverte de la culture française. « Petit à petit, l'oiseau fait son nid » mais sans vous je n'aurais pas pu faire un aussi joli « nid » de vie dans votre pays.

Enfin, j'adresse mes plus profonds remerciements aux membres de ma famille qui m'ont donné à tout moment depuis mon enfance leur soutien, leur amour et leurs encouragements. Je voudrais remercier mes parents, mes frères, ma petite sœur Ly, mon cœur Tuyet Anh et notre fils Minh Quân.

Résumé

Hevea brasiliensis est la seule source commerciale du caoutchouc naturel. La maladie CLF (*Corynespora* Leaf Fall) provoquée par le champignon *Corynespora cassiicola* est une pathologie foliaire de l'hévéa importante en Asie et en Afrique. Les épidémies sont liées au développement de nouvelles variétés clonales très sensibles. Une méthode conductimétrique de phénotypage de la réponse de l'hévéa aux exsudats de *C. cassiicola* (filtrats de culture ou toxine purifiée) a été développée et caractérisée. Ce test toxinique, sans contact direct avec le champignon lui-même, peut être mis en œuvre sans risque sur les plantations. Après application de gouttes d'exsudats sur des folioles détachées d'un génotype d'hévéa, deux mesures de conductivité C1 et C2 sont réalisées avant et après autoclavage, et le pourcentage de fuite d'électrolyte dû au traitement, $\%FE = 100 \cdot C1/C2$, est calculé. L'influence de différents facteurs tels que le stade foliaire et la durée d'incubation, a été précisée. Une corrélation positive a été trouvée entre les réponses au test toxinique et à l'inoculation par des conidies du champignon. La pertinence de la correction de C1 par C2 a été analysée.

Deux études du test toxinique ont été réalisées pour une série de clones d'hévéa, d'une part en France avec des plantes en pots cultivées en serre, et d'autre part en Côte d'Ivoire, dans les conditions normalement envisagées pour ce test, avec des folioles provenant de jardins à bois de greffe. La répétabilité entre ces deux études est imparfaite mais néanmoins satisfaisante. Le critère $\%FE$ est apparu plus sensible et plus précis que la mesure de la surface de nécrose induite (SN). Une variabilité importante de la sensibilité des clones et de l'agressivité des exsudats a été observée, avec l'existence d'interactions. L'analyse du déterminisme génétique de la réponse au test toxinique a été menée par détection de QTL sur deux populations de la famille biparentale d'hévéa PB260 x RRIM600, analysées sur deux sites en Côte d'Ivoire. Une carte génétique a été construite au préalable avec 308 marqueurs SSR. Le phénotypage des deux populations a révélé un déterminisme polygénique, sans effet monolocus majeur, avec, pour l'ensemble des exsudats fongiques étudiés, 13 QTL répartis sur 10 groupes de liaison et présentant des pourcentages d'explication R^2 variant de 10 à 20 %. Sur les deux sites, deux QTL ont été identifiés conjointement pour le filtrat CCP et pour la toxine Cas1 purifiée à partir du filtrat CCP, démontrant l'importance de Cas1 pour la toxicité de ce filtrat. Des corrélations positives entre certains filtrats ont été observées, avec des profils de réponse similaires et des QTL communs.

Le test toxinique pourrait remplacer avantageusement la méthode d'inoculation conidienne. Cependant, la valeur prédictive du test pour la sensibilité des clones d'hévéa à la maladie CLF en plantation reste à caractériser. Une meilleure connaissance de l'épidémiologie du pathosystème *H. brasiliensis* x *C. cassiicola* contribuerait à l'objectif de sélection, et plus largement à la conception de méthodes de lutte ou d'évitement.

Mots clés : *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, CLF, test toxinique, exsudat fongique, effecteur, filtrat de culture, cassiicoline, fuite d'électrolytes, cartographie génétique, SSR, QTL.

Abstract

Hevea brasiliensis is the only commercial source of natural rubber. The CLF (*Corynespora* Leaf Fall) disease caused by the fungus *Corynespora cassiicola* is an important foliar pathology of the rubber tree in Asia and Africa. The disease progression is related with the development of new highly sensitive clonal varieties. A phenotyping method based on the measurement of electrolyte leakage in response to *C. cassiicola* exudates (culture filtrates or purified toxin) was developed and characterized. This test, without direct contact with the fungus itself, can be implemented without risk for plantations. After application of exudate samples on detached leaflets, conductivity is measured before (C1) and after (C2) autoclaving, and the percentage of electrolyte leakage $\%FE=100 \times C1/C2$ is calculated. The influence of different factors such as leaf stage or the duration of incubation has been clarified. A positive correlation was found between the responses to the toxin test and to conidial inoculation. The pertinence of C1 correction by C2 was analyzed.

Two toxin test studies have been carried out for a set of rubber clones, in France, with potted plants in greenhouse, and also in Ivory Coast, under the conditions normally considered for this test, with leaflets from budwood gardens. Repeatability between these two experiments was not perfect but nevertheless satisfying. The $\%FE$ character was found more sensitive and accurate than surface necrosis (SN) measurement. A significant variability in clone susceptibility and treatment virulence was observed, with clone x treatment interactions. The genetic determinism of sensitivity to *C. cassiicola* exudates was analyzed using the toxin test, by QTL detection on two populations of the biparental rubber family PB260 x RRIM600, in two field trials in Ivory Coast. A genetic map was previously built, using 308 SSR markers. Phenotyping of the two progeny populations revealed a polygenic determinism, without major monolocus effect. Over all the fungal exudates, 13 QTL distributed over 10 different linkage groups were identified, with percentages of explanation R^2 varying from 10 to 20 %. On both sites, two QTL have been identified jointly for both the culture filtrate CCP and the toxin Cas1 purified from CCP. Positive correlations have been observed between some of the filtrates, with similar response profiles and common QTL.

The toxin test could usefully replace the conidial inoculation method. However, the value of the test for predicting rubber clones susceptibility to the CLF disease in field conditions remains to be better characterized. Better understanding of the epidemiology of the *H. brasiliensis* x *C. cassiicola* pathosystem would contribute to the breeding objective, and more broadly to the design of control or avoidance methods.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, CLF, toxic test, fungal effector, culture filtrate, cassiicolin, electrolyte leakage, fungal exudate, genetic mapping, effector, SSR, QTL.

Abréviations

%FE	Pourcentage de Fuite d'Electrolytes
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µS/cm	Unité de conductivité (micro Siemens/centimètre)
ACN	Acéto-Nitrile
Act	Actine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AGAP	Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales
ANOVA	Analyse de variance
ARN	Acide ribonucléique
Avr	Avirulence
BIDAP	Biologie Intégrative, Diversité et Amélioration des Plantes
C1	Conductivité mesurée avant l'autoclavage
C2	Conductivité mesurée après l'autoclavage
Cas	Cassiocoline
CF	Clermont-Ferrand
CI	Côte d'Ivoire
CIRAD	Centre de Coopération Internationale en Recherches Agronomiques pour le Développement
CLF	<i>Corynespora</i> Leaf Fall
cM	Centi-Morgan
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DTI	Damage-Triggered Immunity
EST	Expressed Sequence Tags
ETI	Effector-Triggered Immunity
ETS	Effector-Triggered Susceptibility
FDR	Firestone Dothidella Resistant
g	Gramme
h	Heure
hb	<i>Hevea brasiliensis</i>
HR	Hypersensitive Response
HST	Host-Specific Toxin
IFC	Institut Français du Caoutchouc
IM	Interval Mapping
ImageJ	Logiciel de mesure surface de nécrose des feuilles photographiées
IRCA	Institut de Recherches sur le Caoutchouc en Afrique
IRRDB	International Rubber Research and Development Board
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
ITS	Internal Transcribed Spacer

JoinMap 4.1	Logiciel de cartographie génétique, version 4.1
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
L	Litre
LOD	Logarithm of the ODds ratio
LRR	Leucine Rich Repeat
M	Molaire
MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern
MapQTL6	Logiciel de détection de QTL, version 6
MATAB	Mixed Alkyl Tri-methyl Ammonium Bromide
MDF	Madre de Dios Firestone
MEA	Malt Extract Agar
MEA	Malt Extract Agar
mL	Millilitre
MM	Masse Moléculaire
mM	Millimolaire
mm ²	Millimètre carrée
NE	Necrotrophic Effector
ng	Nanogramme
NLR	Nucleotide-binding Leucine-rich Repeat
nm	Nanomètre
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PB	Prang Besar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PIAF	Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et forestier
Pop1	Essai de population 1 de F1 de la famille PB260 x RRIM600, planté à la SOGB
Pop2	Essai de population 2 de F1 de la famille PB260 x RRIM600, planté à la SAPH-Toupah
PR	Pathogenesis Related
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTI	PAMP-Triggered Immunity
QTL	Quantitative Trait Locus
R	Logiciel statistique
RAPD	Random-Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RGAs	Resistance Gene Analogues
RLP	Receptor Like Protein
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RO	Rondonia (Brésil)
ROS	Reactive Oxygen Species
RPC	Reverse Phase Chromatography
RRIC	Rubber Research Institute of Ceylon
RRII	Rubber Research Institute of India

RRIM	Rubber Research Institute of Malaysia
RRIT	Rubber Research Institute of Thailand
RRIV	Rubber Research Institute of Vietnam
SALB	South American Leaf Blight
SAM	Sélection Assistée par Marqueurs
SAPH	Société Africaine de Plantation d'Hévéas
SN	Surface de Nécrose
SNK	Student-Newman-Keuls
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOGB	Société de Grand-Béréby
SSH	Suppressive Subtractive Hybridization
SSP	Small Secreted Protein
SSRs	Simple Sequence Repeats
STS	Sequence Tagged Sites
T	Tonne
TDF	Transcript-Derived Fragments
TFA	TriFluor-Acetate
U	Unité enzymatique
UC	Unité de Croissance
UMR	Unité Mixte de Recherche
UV	Ultraviolet

Liste des figures

Fig 1.1: Etages foliaires d'un jeune hévéa, disposition des verticilles foliaires	8
Fig 1.2: Stades foliaires de l'hévéa.	8
Fig 1.3: Système laticifère de l'hévéa	10
Fig 1.4: Synthèse du caoutchouc chez l'hévéa.	11
Fig 1.5: Exploitation du caoutchouc en plantation.	12
Fig 1.6: Phénomène de la coagulation du latex.....	14
Fig 1.7: Les maladies fongiques des feuilles chez l'hévéa.	16
Fig 1.8: Schéma de la sélection traditionnelle de l'hévéa.	22
Fig 1.9: Symptômes engendrés par <i>Corynespora</i> sur les organes des plantes.....	32
Fig 1.10: Spores du champignon et leur germination.	33
Fig 1.11: Schéma de modèle en zig-zag d'interaction gène pour gène de l'amplitude de défense de la plante vis-à-vis un agent pathogène.	36
Fig 1.12: Structure tridimensionnelle de la cassiicoline	39
Fig 1.13: Effets de la toxine (Cas1) sur l'ultrastructure cellulaire des feuilles d'hévéa.....	40
Fig 2.1: Lieux de recherche, des essais en champ dans le cadre de la thèse.....	48
Fig 2.2: Méthode du test toxinique sur feuille détachée.	54
Fig 3.1: Méthodologie du test toxinique	64
Fig 3.2: Effet de la concentration en toxine (A) et de la durée d'incubation (B) sur les résultats du test toxinique.	69
Fig 3.3: Distribution des données de %FE pour les différentes combinaisons de l'expérience testant l'effet de la position de l'échantillon (clone PB217).	72
Fig 3.4: Sensibilités comparées de huit clones d'hévéa estimées par le test toxinique ou par inoculation conidienne	75
Fig 3.5: Expérience CF. Relation entre les critères %FE et SN, pour 331 combinaisons de 26 clones x 17 traitements.	82
Fig 3.6: Expérience CF. Relation entre les critères %FE et SN. Moyennes par clone.	82
Fig 3.7: Expérience CF. Relation entre les critères %FE et SN. Moyennes par traitement.	82
Fig 3.8: Expérience CI. Relation entre les critères %FE et SN, pour les 300 combinaisons de 20 clones x 15 traitements	85
Fig 3.9: Expérience CI. Relation entre les critères %FE et SN. Moyennes par clone.	85
Fig 3.10: Expérience CI. Relation entre les critères %FE et SN. Moyennes par traitement....	85
Fig 3.11: Comparaison des distributions du critère %FE pour les deux expériences CF et CI.	87

Fig 3.12: Relation entre les données %FE des deux expériences CF et CI, en %FE pour combinaisons de 19 clones x 11 traitements.	88
Fig 3.13: Corrélation entre les valeurs %FE des deux expériences CF et CI pour les moyennes par clone de 11 traitements ($r = 0.76$, seuil de signification $r_s = 0.57$ pour $\alpha = 0.01$).	89
Fig 3.14: Corrélation entre les expériences CF et CI pour les moyennes %FE par traitement toxinique de 19 clones ($r = 0.94$, seuil de signification $r_s = 0.73$ pour $\alpha = 0.01$).	90
Fig 3.15: Expérience CF. Classification des clones (CL) et des traitements (Tr) d'après le critère %FE mesuré sur 27 clones en réponse à 17 traitements	94
Fig 3.16: Expérience CF. Distribution des résidus. Analyse de variance de %FE.	96
Fig 3.17: Expérience CI. Classification des clones (CL) et des traitements (Tr), d'après le critère %FE mesuré sur 20 clones en réponse à 25 traitements.	100
Fig 3.18: Expérience CI. Distribution des résidus. Analyse de variance du critère %FE.....	102
Fig 3.19: Analyse globale des expériences CF et CI. Distribution des résidus.	104
Fig 3.20: Cartographie génétique des deux populations Pop1 et Pop2, et de la combinaison des deux populations.	110
Fig 3.21: Carte génétique synthétique établie à partir de Pop1 + Pop2 de la famille PB260 x RRIM600 (343 génotypes, 308 marqueurs SSR).	111
Fig 3.22: Symptômes foliaires d'attaques de <i>Corynespora</i> observés en champ en Côte d'Ivoire.	114
Fig 3.23: Histogrammes de distribution des valeurs moyennes %FE par individu (Pop1 et Pop2) pour 18 des différents traitements toxiques.	116
Fig 3.24: Histogrammes de distribution des notes d'intensité d'attaque des maladies foliaires observées en champ (en cinq notes).	118
Fig 3.25: Classification ascendante hiérarchique des traitements toxiques appliqués sur la population cartographiée Pop1 (famille PB260 x RRIM600).	120
Fig 3.26: Classification ascendante hiérarchique des traitements toxiques appliqués sur la population cartographiée Pop2 (famille PB260 x RRIM600).	122
Fig 3.27: Cartographie de QTL.	125
Fig 3.28: Variabilité de C2 intra- et inter-unité de croissance (UC).	131
Fig 3.29: Expérience CI. Variabilité inter-clonale du critère C2 : distribution des données C2 mesurées sur 20 clones en réponse au traitement à blanc Tox0.	132
Fig 3.30: Distribution des valeurs de C2 (A) en comparaison avec les valeurs %FE (B) pour différentes concentrations de toxine et différents niveaux de prélèvement des rondelles par rapport au point de dépôt de la toxine (n0).	135
Fig 3.31: Distributions des données C2 en fonction des méthodes pratiquées pour libérer les électrolytes.	136
Fig 3.32: Distribution des données C2 obtenues par la méthode « broyage avant autoclavage », en fonction de la concentration en toxine.	136
Fig 3.33: Expérience CI. Classification des clones (CL) et des traitements (Tr), d'après les critères %FE (A, à gauche) et C1 (B, à droite) mesurés sur 20 clones en réponse à 25 traitements.	142

Liste des tableaux

Tab 2-1. Clones d'hévéa utilisés dans cette étude.....	46
Tab 2-2. Caractéristiques des souches de <i>Corynespora</i> utilisées dans cette étude.....	50
Tab 2-3. Milieu de culture Czapeck modifié (Cz).....	52
Tab 2-4. Caractéristiques des traitements utilisés dans cette étude.	56
Tab 2-5. Présentation des 8 marqueurs utilisés pour le test de conformité (MIsathev).....	59
Tab 3-1. Influence du stade foliaire sur les résultats du test toxinique (en %FE).	66
Tab 3-2. Analyse de variance du critère %FE en fonction du stade foliaire (clone IRCA631) et du traitement toxinique (deux filtrats CCP et CCI6 ; Cas1 à 5 ng/μL ; et deux blancs Cz, Tox0)	66
Tab 3-3. Influence de la durée d'incubation (DI) sur les résultats du test toxinique.....	68
Tab 3-4. Analyse de variance du critère %FE en fonction du clone (GT1 ou PB217), du traitement en toxine Cas1 (0, 1, 5 ou 10 ng/μL) et de la durée d'incubation (24, 48, 72 h). ...	70
Tab 3-5. Influence de la position de la rondelle prélevée.....	72
Tab 3-6. Analyse de variance du critère %FE en fonction de la position des échantillons de clones (GT1 ou PB217), du traitement en toxine Cas1 (0, 1, 5 ou 10 ng/μL).	73
Tab 3-7. Influence de l'agitation lors de la phase de macération	74
Tab 3-8. Analyse de variance du critère %FE mesuré sur le clone PB217 en fonction du facteur « agitation » (présence ou absence) et de traitements en toxine (1, 5 ou 10 ng/μL)...	74
Tab 3-9. Comparaison de deux méthodes de mesure des réponses de huit clones à deux isolats : test toxinique et par inoculation conidienne	75
Tab 3-10. Analyse de variance du critère %FE et (SN, en mm ²) mesurés respectivement par le test toxinique et le test d'inoculation.	76
Tab 3-11. Comparaison des réponses de huit clones d'hévéa à deux souches de <i>Corynespora</i> , estimées par le test toxinique ou par inoculation conidienne (spores CCI13 et CCP).	76
Tab 3-12. Description des expériences de test toxinique.	78
Tab 3-13. Expérience CF. Réponses en %FE et SN de 26 clones à 17 traitements.	80
Tab 3-14. Expérience CI. Réponses en %FE et en SN de 20 clones à 15 traitements.	84
Tab 3-15. Pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE) en réponse de 19 clones à 11 traitements, pour les deux expériences CF et CI.	86
Tab 3-16. Moyennes par clone des 11 traitements toxiques pour les deux expériences CF et CI.	89
Tab 3-17. Moyennes par traitement toxinique de 19 clones pour les deux expériences CF et CI.	90
Tab 3-18. Corrélations entre les réponses aux 11 traitements dans les deux expériences CF et CI entre les moyennes par traitement toxinique pour chacun des 19 clones.....	91

Tab 3-19. Corrélations entre les réponses des 19 clones dans les deux expériences CF et CI pour chacun des 11 traitements.	91
Tab 3-20. Expérience CF. Pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE) mesuré sur 27 clones en réponse à 17 traitements.	92
Tab 3-21. Expérience CF. Analyse de variance du critère %FE mesuré sur 27 clones en réponse à 17 traitements.	97
Tab 3-22. Expérience CF. Effets principaux (clone et traitement) et effet interactif influençant le critère %FE, pour 27 clones et 17 traitements (cf Tab 3-21).	97
Tab 3-23. Expérience CI. Pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE) mesurés sur 20 clones en réponse à 25 traitements.	98
Tab 3-24. Expérience CI. Analyse de variance du critère %FE mesuré sur 20 clones en réponse à 25 traitements (cf Tab 3-23).	102
Tab 3-25. Expérience CI. Effets principaux (clone et traitement) et effet interactif en %FE de 20 clones et 25 motifs (cf Tab 3-23).	103
Tab 3-26. Expérience CF et CI regroupées. Analyse de variance du critère %FE mesuré sur 22 clones en réponse à 18 traitements.	104
Tab 3-27. Expériences CF et CI regroupées. Présentation des 56 effets d'interaction significatifs.	105
Tab 3-28. Cartographie génétique des deux populations issues de la famille PB260 x RRIM600 et phénotypées en champ sur les sites de SOGB (Pop1) et Toupah (Pop2).	108
Tab 3-29. Caractérisation des cartes obtenues pour chaque population (Pop1 et Pop2) et pour la combinaison des deux populations.	109
Tab 3-30. Héritabilité du critère %FE sur les deux populations Pop1 à la SOGB et Pop2 à Toupah (famille PB260 x RRIM600).	112
Tab 3-31. Matrice des corrélations par paires entre les valeurs moyennes par individu pour les 10 exsudats et pour la notation d'attaque de maladie en champ de Pop1 faite en novembre 2014.	118
Tab 3-32. Matrice des corrélations par paires entre les valeurs moyennes par individu pour les 13 exsudats et pour les notations d'attaque de maladie en champ de Pop2 faite en septembre 2015.	121
Tab 3-33. Détection de QTL associés d'une part au critère %FE mesuré pour 19 traitements toxiques (blancs inclus) et d'autre part aux deux notations d'attaque de maladie en champ pour le phénotypage des populations Pop1 et Pop2 (famille PB260 x RRIM600) à la SOGB et à Toupah.	124
Tab 3-34. Effets alléliques des QTL détectés au critère %FE mesuré lors du phénotypage des populations Pop1 et Pop2 (famille PB260 x RRIM600) à la SOGB et à Toupah.	126
Tab 3-35. Dispositif d'étude de la variabilité intra-clonale du paramètre C2.	131
Tab 3-36. Analyse de variance du critère C2 pour le facteur de stade foliaire au sein d'une unité de croissance (UC) et pour la variation entre des unités portées par des plantes différentes.	131
Tab 3-37. Analyse de variance du critère C2 sur 20 clones traités avec quatre concentrations en toxine Cas1 purifiée (0, 1, 5 et 10 ng/μL).	135

Tab 3-38. Dispositif d'étude de différentes méthodes de mesure de C2.	136
Tab 3-39. Analyse de variance des critères C1 et %FE mesurés sur 20 clones en réponse à 25 traitements, en Côte d'Ivoire.	138
Tab 3-40. Analyse de variance du critère C2 mesuré sur 20 clones en réponse à 25 traitements, en Côte d'Ivoire	138
Tab 3-41. Expérience CI. Coefficients de corrélation de Pearson entre les moyennes par clone en fonction des critères mesurés C1, C2 et %FE, pour une gamme de 20 clones d'hévéa en réponse à 25 traitements.	140
Tab 3-42. Expérience CI. Coefficients de corrélation de Pearson entre les moyennes par traitement en fonction des critères mesurés C1, C2 et %FE, pour une gamme de 20 clones d'hévéa en réponse à 25 traitements.	141
Tab 3-43. Coefficients de corrélation de Pearson entre les moyennes par traitement, en fonction des critères mesurés (C1, C2) ou calculé (%FE).	145
Tab 3-44. Comparaison des QTL détectés sur la base du critère C1 comparativement au %FE.	146

Introduction

Hevea brasiliensis est la seule espèce cultivée produisant en grande culture du caoutchouc naturel dont 70 % de la production est utilisée dans l'industrie du pneumatique. Grâce à ses propriétés spécifiques, cet agro-matériau reste compétitif vis-à-vis des élastomères de synthèse (caoutchouc synthétique) et représente actuellement 42 % de l'ensemble des caoutchoucs (naturel + synthétique). Originaire d'Amazonie, l'hévéa n'est devenu une culture qu'après le transfert de matériel végétal en Asie en 1876. Actuellement, l'hévéaculture est pratiquée pour 92 % des surfaces en Asie du sud-est et 5 % en Afrique. Seulement 3 % des surfaces sont situées en Amérique latine du fait de la présence sur ce continent de la maladie sud-américaine des feuilles ou SALB (South-American Leaf Blight) due au champignon *Microcyclus ulei*. Un projet de recherche important est mené sur cette maladie dans le cadre d'un projet associant le Cirad et Michelin au Brésil.

En Asie et en Afrique, la maladie fongique des feuilles de l'hévéa due au champignon *Corynespora cassiicola*, dite CLF (*Corynespora* Leaf Fall), est considérée comme un risque important pour l'hévéaculture depuis la première épidémie importante survenue au Sri-Lanka en 1985. Le pathosystème *Hevea brasiliensis* x *Corynespora cassiicola* est donc devenu un sujet de recherche important depuis une trentaine d'années compte tenu de l'émergence d'épidémies dans différentes régions. En Europe, l'Institut Français du Caoutchouc est une association regroupant trois sociétés concernées par l'hévéaculture (Michelin, Siph et Socfin). Confronté aux épidémies survenues sur les plantations de ses membres au Cameroun, en Indonésie et en Afrique de l'ouest, l'IFC soutient financièrement les recherches du Cirad sur ce sujet, et apporte un appui logistique et des moyens humains et matériels pour la réalisation de recherches sur les plantations. Les résultats déjà acquis ont été publiés sous forme de thèses (Breton, 1997 ; Déon, 2012) et d'articles scientifiques (notamment Déon 2012, 2014 ; Lopez, 2015).

Une difficulté de l'étude de cette maladie tient au fait qu'elle n'est pas observable en permanence dans les plantations. Les attaques surviennent généralement 4 à 5 ans après le planting des parcelles, lors de la fermeture de la canopée, sur des nouveaux clones en développement qui se révèlent sensibles. Parfois une épidémie s'arrête quelques années après son émergence. Par ailleurs les planteurs mettent en place des méthodes de lutte (traitements phytosanitaires, arrachage des clones sensibles) qui permettent au moins temporairement de

rétablir un bon état sanitaire général dans les plantations. On a donc cherché à mettre au point des méthodes d'évaluation en conditions contrôlées de la résistance/sensibilité des variétés clonales d'hévéa à la diversité des souches du champignon (Breton et al., 2000). Un outil efficace de ce type permettrait d'explorer la diversité du pathosystème *Hevea* x *Corynespora*, et serait potentiellement utile pour la sélection précoce de nouveaux clones, ou au moins pour l'identification précoce des clones les plus sensibles afin d'interrompre leur développement.

L'objectif de la présente recherche était donc l'évaluation et la mise en œuvre expérimentale d'une méthode de phénotypage simple et rapide, le « test toxinique », pour l'étude de l'interaction *Hevea brasiliensis* x *Corynespora cassiicola*. Faisant suite aux méthodes présentées par Breton et al. 2000 (test de flétrissement, inoculation de spores sur feuilles détachées), ce test toxinique représente une adaptation d'un test conductimétrique utilisé sur les feuilles de différentes espèces pour des recherches en écophysiologie (Lutts et al., 1997 ; Herbette et al., 2005 ; Mai et al., 2009). Le principal intérêt de ce test est de pouvoir traiter les folioles d'hévéa avec des solutions toxiques, toxine purifiée ou filtrats de culture, sans contact avec le champignon lui-même. On pourrait ainsi tester sur les sites de plantation, sans risque de dissémination de pathogène, la sensibilité de nombreux clones à des filtrats provenant de gammes diversifiées de souches du champignon. Une première étude de faisabilité a été réalisée en 2013 à Clermont-Ferrand dans l'expérience conduite par Marine Déon, dont les résultats sont analysés et présentés ici. Ce mémoire présente les expériences réalisées ensuite en Côte d'Ivoire et à Montpellier pour la caractérisation du test toxinique, ainsi que l'évaluation de différents clones et traitements toxiques. Les principaux résultats ont été publiés cette année dans un article accepté par le journal Plos One (Annexe 5).

Ce mémoire de thèse s'organise en quatre chapitres. Dans le premier chapitre, on présente l'hévéa et le pathosystème *Hevea brasiliensis* x *Corynespora cassiicola*, l'état des connaissances et le détail des objectifs. Dans le deuxième chapitre, on décrit le matériel végétal et les méthodes utilisés. Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats. Enfin, on présente une discussion générale des résultats, les conclusions et les perspectives de cette recherche.

Chapitre 1 - Présentation de l'hévéaculture et du pathosystème *Hevea x Corynespora* dans une perspective d'amélioration génétique

1.1 Le caoutchouc naturel et sa production par *Hevea brasiliensis*

1.1.1 Historique de la production du caoutchouc naturel

Le caoutchouc naturel est un polymère de l'isoprène $(C_5H_8)_n$, issu du latex de plus de 2500 espèces végétales provenant de 300 genres et 7 familles différentes (Backhaus, 1985; Cornish et al., 1993; Lewinsohn, 1991). Sa propriété spécifique est l'élasticité. Sa production agricole (hévéaculture) dépend d'une seule espèce, *Hevea brasiliensis*. Le caoutchouc naturel était connu depuis plus de 2000 ans par les indiens d'Amérique latine : le caoutchouc était utilisé pour certaines cérémonies religieuses et pour la production d'objets utilitaires imperméables (chaussures, balles, toiles enduites, torches...). A la suite de la découverte de l'Amérique par l'explorateur italien Christophe Colomb en 1492, le caoutchouc a été introduit en Europe. Les botanistes Français Fresneau et Fusée-Aublet ont décrit les premières espèces connues et effectué les premières études scientifiques. L'anglais Hancock invente la mastication du caoutchouc pour lui donner une plus grande plasticité. Charles Macintosh obtient un produit imperméable par dissolution du caoutchouc. Cependant l'utilité du caoutchouc reste fortement limitée par certains inconvénients : le caoutchouc devient cassant à basse température et collant au soleil. En 1839, Goodyear invente la vulcanisation, procédé consistant à chauffer le latex en présence de soufre pour stabiliser l'élasticité du matériau. Cette invention a révolutionné l'usage de ce polymère et déclenché une exploitation intensive des hévéas natifs en forêt amazonienne. De 1887 à 1892, plusieurs applications de l'utilisation du caoutchouc naturel dans l'industrie pneumatique furent développées telles que les chambres à air gonflables et les pneus démontables pour les roues de vélos et de voitures. Cette époque a marqué le début du développement des industries automobiles et aéronautiques, contribuant à l'explosion de la demande de caoutchouc naturel. Cette demande de caoutchouc en constante augmentation a suscité le développement de l'hévéaculture hors de sa zone d'origine, en Asie et en Afrique.

1.1.2 Domestication de l'hévéa

En 1876, l'anglais Henry Wickham rapporta au jardin botanique de Kew Garden (à Londres) soixante-dix mille graines d'hévéa (*Hevea brasiliensis*) collectées au Brésil dans la région du confluent du rio Tapajos et du fleuve Amazone. Seules 4 % de ces graines ont germé. Au mois d'août suivant, mille neuf cent dix-neuf plantules ont été expédiées au jardin botanique de Ceylan, cinquante à Singapour et dix-huit en Indonésie (Jardin botanique de Bogor). En novembre 1876, un autre anglais, Robert Cross, a collecté mille quatre-vingts graines d'hévéa (*H. brasiliensis*) dans le bas du bassin Amazonien. Elles ont également été expédiées au jardin botanique de Kew Garden (à Londres) mais seules 26 plantes ont survécu et ont été rajoutées à la population Wickham initiale. Le 11 juin 1877, vingt-deux plants d'hévéa (sans distinction de la source Wickham ou Cross) ont été expédiées de Kew au Jardin botanique de Singapour. En 1883, les plantes d'hévéa d'origine Wickham à Ceylan ont donné des fruits, et en 1889, les arbres plantés à Singapour ont aussi donné des fruits. Les premières graines d'hévéa récoltées hors de l'aire amazonienne d'origine ont permis le développement des premières plantations. Cette population dite « Wickham » a servi de base à l'amélioration génétique en Asie et en Afrique et à l'obtention de la plupart des variétés cultivées actuellement dans le monde (Compagnon, 1986; Webster and Baulkwill, 1989).

À partir de 1910, l'hévéaculture s'est développée principalement en Malaisie, en Indonésie (Java et Sumatra), au Sri-Lanka, en Inde, en Thaïlande ainsi que dans la péninsule indochinoise. En Malaisie, la superficie cultivée atteignait 900 000 d'hectares dès 1920 et 1.3 million d'hectares en 1937. En Thaïlande les premiers hévéas ont été plantés en 1903 sur l'île de Phuket et les plantations ont rapidement couvert plus du tiers des terres cultivables de cette île. En Indonésie, la culture industrielle de l'hévéa a été développée principalement au nord de Sumatra et Java.

Au Vietnam, c'est Alexandre Yersin (bactériologiste découvreur du bacille de la peste) qui a établi les premières plantations en 1899 à Nha Trang. Ensuite les plantations industrielles se sont étendues vers les « terres rouges », plus riches, au sud-est du Vietnam (Plantations dites des Terres Rouges ou Société des Plantations d'Hévéas). La société Michelin investit à grande échelle à partir de 1925, ce qui a permis à l'Indochine dès 1939 d'exporter près de 63 000 tonnes de caoutchouc (Ehret, 1941).

En Afrique, l'hévéa fut introduit au jardin botanique d'Aburi, au Ghana en 1893, et en Guinée en 1898. En 1897-1898, l'entreprise d'horticulture d'Alexandre Godefroy-Lebeuf envoya aussi des graines d'hévéa au jardin botanique de Boma, dans l'Etat indépendant du Congo (actuelle République Démocratique du Congo). La première récolte de latex d'hévéa dans ce pays a eu lieu en 1904. Le Congo belge, le Liberia, le Nigéria, et à un moindre degré le Cameroun, ont été les premiers pays africains à développer l'hévéaculture, sous l'impulsion des puissances coloniales, ou celle des USA dans le cas du Liberia indépendant. Un important développement de l'hévéaculture est suscité par les planteurs français en Afrique de l'ouest après leur départ d'Indochine, à partir de 1954.

L'hévéaculture mondiale produit actuellement environ 12 millions de tonnes de caoutchouc sec par an sur environ 11.5 millions d'hectares de terres cultivées (à comparer aux 150 millions d'hectares de cultures pérennes et aux 1500 millions d'hectares de terres cultivées dans le monde). Du fait de la maladie sud-américaine des feuilles ou SALB (South American Leaf Blight) causée par le champignon *Microcyclus ulei*, l'hévéaculture en Amérique latine produit seulement 2.7 % de l'ensemble du caoutchouc naturel produit dans le monde, et l'Afrique atteint seulement 4.9 %, tandis que l'Asie du sud-est assure 92.4 % de la production (IRSG 2016, <http://www.rubberstudy.com/>). On peut penser que l'Afrique dispose d'avantages compétitifs par rapport à l'Asie pour l'hévéaculture du fait de faibles coûts de main d'œuvre et de surfaces agricoles disponibles encore assez importantes. Pourtant, bien que la surface de l'hévéaculture africaine augmente en valeur absolue, sa part a baissé de 7 % à 4 % depuis 1970. En Asie, les surfaces de terre disponibles deviennent rares et le coût de la main d'œuvre augmente. Les surfaces en hévéa des pays africains ne sont pas connues avec précision. En Côte d'Ivoire (premier producteur africain), l'hévéaculture couvrirait actuellement 318 000 ha. Les productions sont mieux connues : 265 000 T en Côte d'Ivoire, 69 000 T au Liberia, 57 000 T au Nigéria, 55 000 T au Cameroun, 20 000 T au Gabon, 17 000 T au Ghana, et 9 000 T au Congo-RDC, soit un total 492 000 T pour l'Afrique.

Les recherches pour le développement de l'hévéaculture ont d'abord été très intenses en Indonésie (Dijkman, 1951) puis en Malaisie. En Indonésie, le greffage de l'hévéa est mis au point par Van Helten (1918). Cette technique a permis de multiplier végétativement les variétés d'hévéa performantes sous forme de clones de greffe. En 1942, sur un total planté de 3.6 millions d'hectares, près de 13 %, soit 475 000 hectares, étaient plantés avec des clones d'hévéa obtenus par greffage. Les performances des clones greffés ne sont devenues

véritablement convaincantes pour les planteurs qu'à partir de 1950, après une première phase de sélection clonale.

1.1.3 Description botanique et génétique d'*Hevea brasiliensis*

Appartenant à l'ordre des *Malpighiales* et à la famille des *Euphorbiaceae*, le genre *Hevea* s'étend dans la forêt amazonienne sur une aire de près de six millions de km². Il est diploïde, $2n = 36$ chromosomes, monoïque et fortement allogame. L'hévéa est facilement reconnaissable par sa feuille dotée d'un long pétiole et de 3 folioles, son fruit comprenant presque toujours trois graines, et ses graines dont la morphologie et les dessins de la pigmentation superficielle du tégument externe permettent de distinguer les espèces et les variétés clonales les unes des autres. Le genre *Hevea* comprend 10 espèces dont trois comportent deux à trois sous-espèces différentes (Schultes, 1990) :

- 1) *Hevea benthamiana* Mueller-Arg.
- 2) *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. de Juss) Mueller-Agr.
- 3) *Hevea camargoana* (ou *camargoensis*) Pires
- 4) *Hevea camporum* Ducke
- 5) *Hevea guianensis* Aublet
 - *Hevea guianensis* Aublet var. *lutea* (Spruce ex Benth.) Ducke & R. E. Schultes
 - *Hevea guianensis* Aublet var. *marginata* (Ducke) Ducke
- 6) *Hevea microphylla* Ule
- 7) *Hevea nitida* Mart. ex Muller-Arg. var. *nitida*
 - *Hevea nitida* Mart. var. *toxicodendroides* (R. E. Schultes and Vinton)
- 8) *Hevea pauciflora* (Spruce ex Benth.) Mueller-Arg. var. *pauciflora*
 - *Hevea pauciflora* (Spruce ex Benth.) Mueller-Arg. var. *coriacea* Ducke
- 9) *Hevea rigidifolia* (Spruce ex Benth.) Mueller-Arg.
- 10) *Hevea spruceana* (Benth.) Mueller-Arg.

Outre ces espèces et sous-espèces, il existe des hybrides interspécifiques spontanés et fertiles en Amazonie occidentale, où les espèces *H. benthamiana*, *H. brasiliensis*, *H. guianensis*, et *H. pauciflora* coexistent (Seibert, 1947). Toutes les espèces du genre *Hevea* produisent du latex, mais seule *H. brasiliensis* a été cultivée et commercialisée en raison de son important potentiel de production et des propriétés technologiques utiles de son caoutchouc (Archer and Audley, 1987). L'aire de distribution de l'espèce *H. brasiliensis* couvre la moitié sud du bassin amazonien.

L'hévéa est un grand arbre à croissance rapide dont la taille peut dépasser 40 m de hauteur dans son milieu naturel, l'Amazonie, et atteindre facilement 1 à 3 m de circonférence. Le tronc est cylindrique, lisse, de couleur gris-vert, les branches se forment à partir de 3 m de hauteur en moyenne. En plantation les variétés sont multipliées végétativement par greffage sur des porte-greffes issus de graines et plantées à des densités de l'ordre de 500 arbres/ha. Seule la partie aérienne tronc/couronne est donc clonale, le système racinaire étant génétiquement différent pour chaque arbre. Les arbres de plantation n'atteignent généralement pas les mêmes dimensions que les arbres âgés en milieu naturel pour deux raisons. D'une part la durée de vie d'un hévéa cultivé en plantation dépasse rarement 40 ans. D'autre part, alors que les croissances en hauteur et en épaisseur de tronc sont rapides pendant les premières six années précédant la saignée, celle-ci, nécessitant le renouvellement du latex, provoque un détournement métabolique du saccharose issu de la photosynthèse et génère un fort ralentissement de la croissance des arbres en épaisseur de tronc (Gohet et al., 1996) mais aussi en hauteur (Clément-Demange, communication personnelle). La taille des arbres adultes en plantation dépend de la densité de la parcelle en arbres vivants, de l'âge des arbres et de l'intensité d'exploitation. Les arbres peuvent atteindre des hauteurs de 15 à 20 mètres de hauteur entre 5 et 10 ans. Au Cambodge, sur une parcelle très âgée (plantée en 1924 sur la plantation de Chup) et de faible densité (environ 100 arbres par hectare), on a mesuré en 2005 une hauteur des arbres de 37 mètres. Les arbres sont couramment mis en saignée quand la circonférence des troncs atteint 50 cm (16 cm de diamètre) à 1 m au-dessus du sol. Vers 30 ans, les peuplements saignés d'arbres greffés ont généralement un diamètre de tronc d'environ 30 cm.

En conditions favorables de croissance et de production de latex, l'hévéa doit disposer d'au moins 1500 heures d'ensoleillement annuel, d'une pluviosité annuelle supérieure à 1500 mm, de températures élevées (environ 26 °C en moyenne) et d'une forte humidité atmosphérique (plus de 80 %). Le stress hydrique et le froid non gélif (en dessous de 15 °C) constituent des facteurs limitants importants, notamment dans les zones à longue saison sèche ou en altitude (au-dessus de 600 mètres).

La croissance du système aérien est de nature rythmique (Combe and Plessix, 1974; Hallé and Martin, 1968) (Fig 1.1 et 1.2). Les feuilles sont composées de trois folioles (rarement quatre) allongées et disposées à l'extrémité d'un long pétiole. Le cycle morphogénétique complet aboutissant à la formation d'une unité de croissance sur l'axe principal dure en moyenne 42 jours. Il peut être subdivisé en quatre stades :

- Stade A (débourrement) : les écailles du bourgeon terminal s'ouvrent et la nouvelle unité de croissance apparaît. Ce stade dure en moyenne neuf jours.
- Stade B (croissance) : l'élongation des entre-nœuds s'accompagne de l'apparition de feuilles très anthocyaniques et brillantes ; les limbes de dimension réduite sont d'abord dressés verticalement, puis pointent vers le sol ; la couleur rouge s'estompe peu à peu (11 jours).
- Stade C (maturation foliaire) : les limbes subissent un accroissement rapide, ils sont toujours pendants et flasques, prenant une couleur vert clair (10 jours)
- Stade D (maturité) : les limbes se raidissent et se redressent, leur couleur verte s'intensifie, ce stade dure 12 jours ou plus suivant les conditions du milieu.

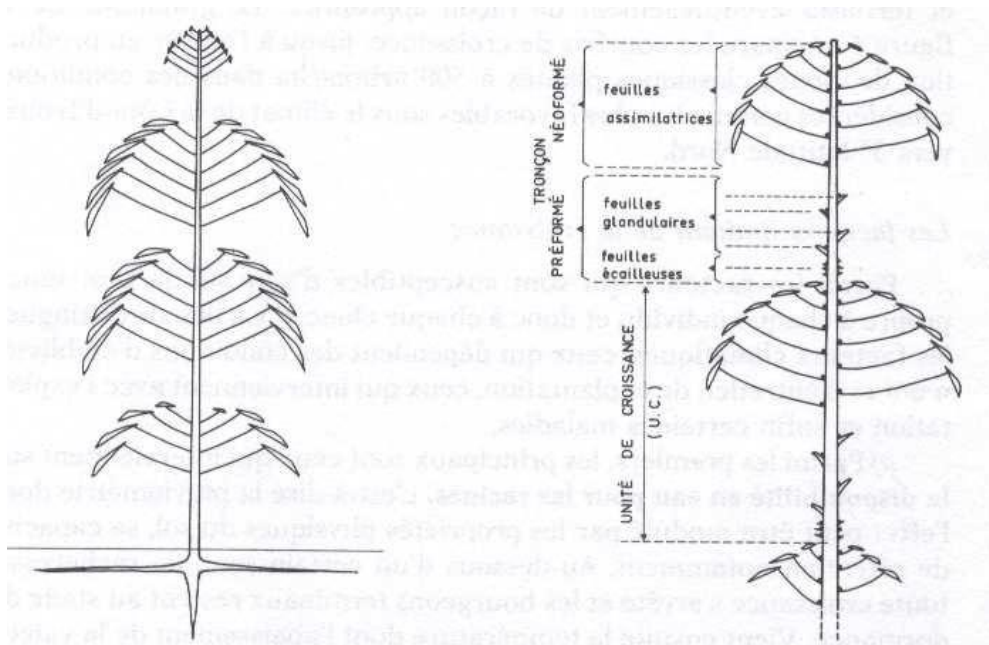


Fig 1.1: Etages foliaires d'un jeune hévéa, disposition des verticilles foliaires (Combe and Plessix, 1974).

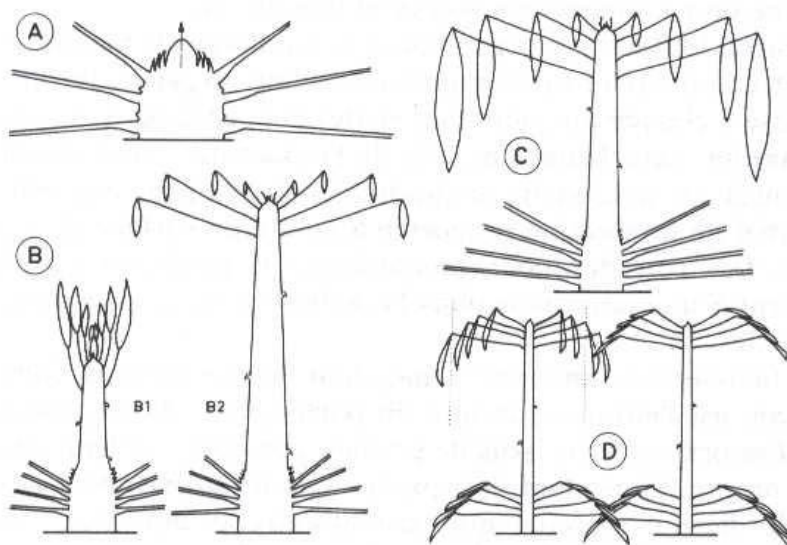


Fig 1.2: Stades foliaires de l'hévéa. (Hallé and Martin, 1968)

A partir de 5 ans, les feuilles sont renouvelées chaque année en saison sèche. C'est le phénomène naturel de défoliation-refoliation, appelé hivernage, qui dure de 1 à 2 mois. Ce phénomène physiologique est un facteur pris en compte lors de la sélection des clones vis-à-vis des attaques par des champignons pathogènes foliaires. En effet, une défoliation naturelle précoce peut permettre une refoliation avant la reprise des pluies, dans des conditions climatiques défavorables au développement des champignons pathogènes foliaires. La défoliation artificielle est parfois pratiquée, pour la même raison.

L'hévée est fortement allogame et hétérozygote. La floraison se produit une ou deux fois par an selon les régions, plutôt en saison sèche, à un moment de forte intensité lumineuse et de faible humidité (Yeang, 2007). L'hévée est monoïque. Les fleurs mâles et femelles sont portées par des inflorescences de type racème. Les fleurs femelles, moins nombreuses que les mâles, sont disposées à l'extrémité des axes primaires et secondaires du racème. Sur une inflorescence donnée, les fleurs mâles arrivent à maturité avant les fleurs femelles (protandrie). Bien qu'aucun système d'auto-incompatibilité n'ait été décrit à ce jour chez l'hévée, l'analyse de descendance avec des marqueurs génétiques a permis de montrer que le mode de reproduction est dans la plupart des cas fortement allogame (Lidah et al., 2007). La pollinisation est entomophile et anémophile. L'hévée, jamais sélectionné pour ses fruits ou ses graines, a une faible fertilité femelle. Qu'elles soient pollinisées naturellement ou manuellement, les fleurs femelles fécondées ne donneront des fruits que dans environ 3 % des cas (Leconte, 1984; Webster and Baulkwill, 1989). Le fruit, arrive à maturité environ cinq mois après la fécondation. Il est constitué d'une capsule à trois loges (parfois quatre) avec donc trois graines qui sont projetées à plusieurs mètres de distance lors de l'écatement du fruit. Les graines peuvent présenter des dimensions variables selon les clones et leur forme est généralement ronde à oblongue, de couleur marron avec des taches blanchâtres.

Le génome haploïde de l'*H. brasiliensis* comporte 18 paires de chromosomes ($2n = 36$). La séquence du génome de cette espèce a été récemment publiée ; selon ces travaux, la longueur physique du génome de l'hévée est estimée à 1.47×10^9 paires de bases (Tang et al., 2016).

Les caractéristiques de l'arbre (longueur du cycle reproductif, hétérozygotie, dépression de vigueur consanguine) ont orienté les sélectionneurs vers l'utilisation de la multiplication végétative permettant de cultiver des arbres génétiquement homogènes et provenant d'un même arbre-mère performant (clonage). Le bouturage est apparu rédhibitoire en raison de la perte de juvénilité des bourgeons de tiges qui ne permettaient pas le développement correct du système racinaire. Le type variétal est donc le clone de greffe : des bourgeons axillaires de

feuille, portés par des tiges de bois de greffe, sont utilisés pour le greffage sur des porte-greffes racinaires issus de graines et ayant donc conservé toute leur jeunesse.

1.1.4 Le système laticifère et la production du caoutchouc

1.1.4.1 Physiologie de la production

Chez l'hévéa, le système laticifère est constitué d'un réseau de cellules dont le cytoplasme constitue le latex, connectées entre elles par des anastomoses formant des vaisseaux et constituant ainsi un véritable réseau paracirculatoire (syncytium) et localisées dans l'écorce. Ces vaisseaux laticifères organisés en manteaux laticifères sont générés de façon rythmique à partir du cambium, en couches concentriques. Leur disposition générale est spiralee autour du tronc (Fig 1.3). Le cambium est un méristème secondaire. Cette assise cellulaire génère sur sa partie extérieure les tissus de l'écorce, incluant le phloème (sève élaborée) et les manteaux laticifères, et dans sa partie intérieure les tissus du bois contenant notamment le xylème (sève brute). La saignée de l'écorce doit être limitée en profondeur pour éviter de blesser le phloème et le cambium, ce qui entraverait la régénération de l'écorce. L'électrotomographie d'une coupe dans l'écorce d'un hévéa a montré des cellules laticifères et les tubes criblés où circule la sève élaborée contenant des acides aminés et du saccharose.

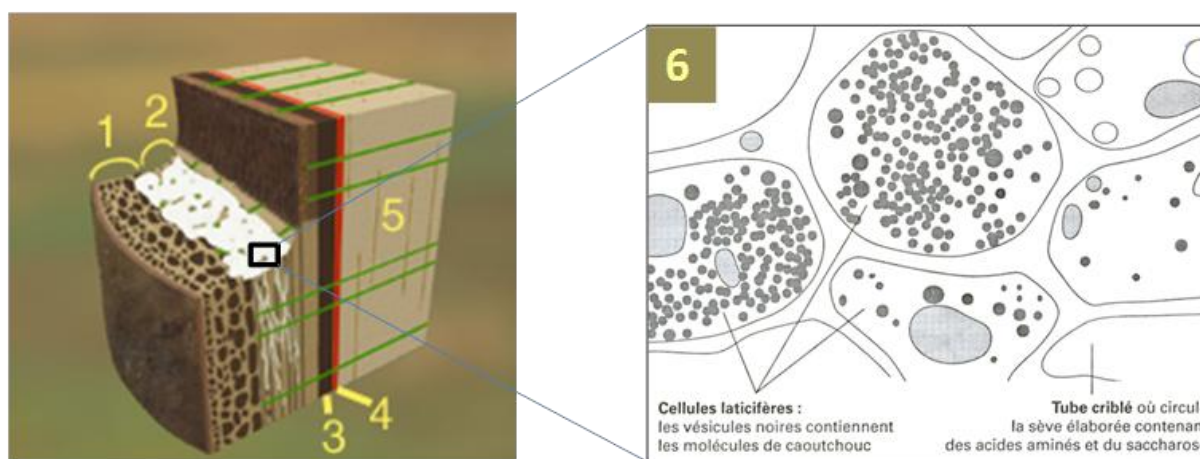


Fig 1.3: Système laticifère de l'hévéa

(1) écorce externe (tissus morts, durs), (2) écorce interne génératrice du latex, (3) phloème conducteur de la sève élaborée, (4) mince couche de cambium, (5) bois conducteur de la sève brute avec les rayons médullaires, en vert, pour les transports horizontaux, (6) Cellules laticifères avec les particules noires contenant les chaînes moléculaires de caoutchouc, et les tubes criblés où circule la sève élaborée contenant des acides aminés et du saccharose.

L'analyse cytologique des cellules laticifères a montré qu'elles contenaient des structures particulières telles que les particules de caoutchouc, les lutoïdes et les particules de Frey-

Wyssling. Les particules de caoutchouc (cis-1,4-polyisoprène) sont enveloppées d'une fine enveloppe phospholipoprotéique chargée négativement (Gomez J. and Moir G., 1979). Cette charge électrique permet leur maintien en suspension dans le cytosol, par répulsion électrostatique. Les particules de caoutchouc représentent 25-45 % du poids frais et plus de 90% du poids sec du latex. Les lutoïdes, représentant 20 % du volume du latex, sont des vésicules vacuolaires entourées d'une membrane semi-perméable chargée négativement. Ces organites sont riches en protéines et contiennent de nombreuses enzymes qui peuvent altérer la stabilité du latex lorsqu'elles sont libérées dans le cytosol, provoquant la coagulation du latex (D'Auzac et al., 1982). Enfin, les particules de Frey-Wyssling sont des plastes modifiés renfermant de nombreuses inclusions lipidiques riches en caroténoïdes (Frey-Wyssling, 1932; Gomez, 1975).

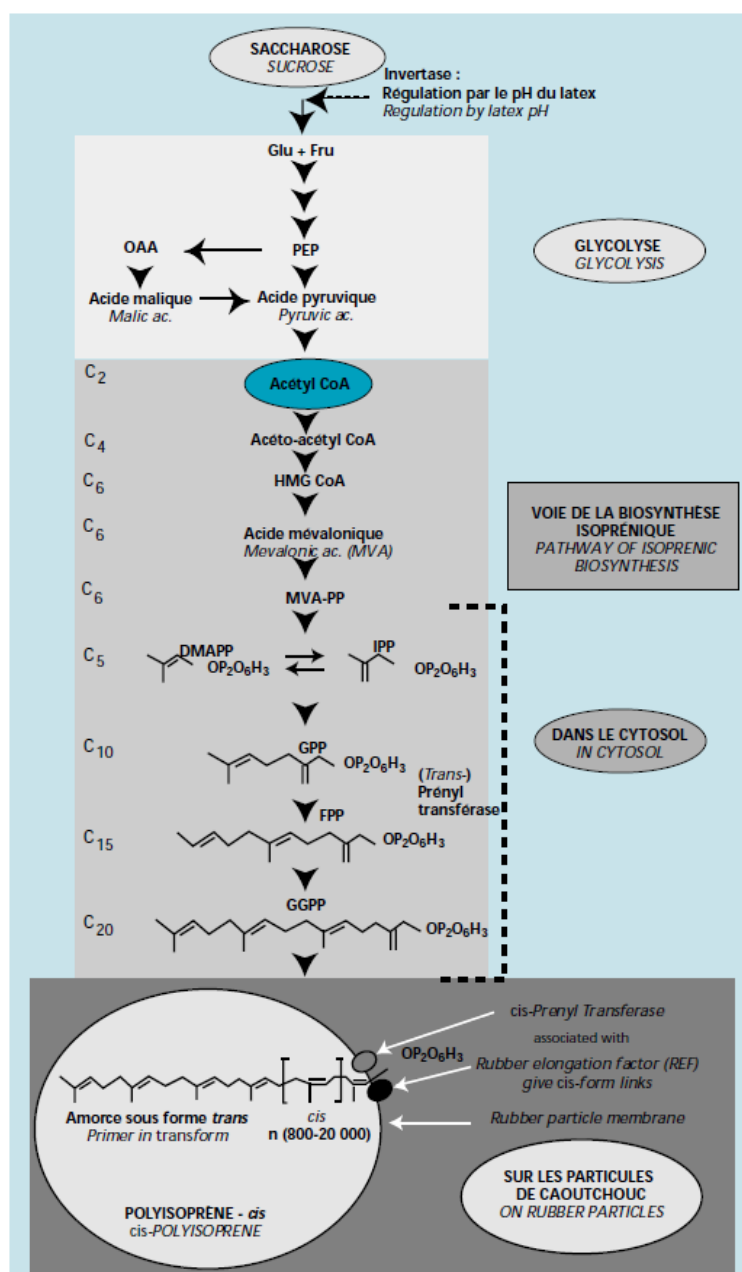


Fig 1.4: Synthèse du caoutchouc chez l'hévéa.

Depuis le saccharose synthétisé à partir des cellules foliaires jusqu'à la synthèse du caoutchouc aux cellules laticifères.

(Archer and Audley, 1987; D'Auzac, 1965)

Le caoutchouc naturel est synthétisé dans le cytosol des cellules laticifères. Des glucides synthétisés par l'activité photosynthétique des feuilles sont transportés dans le tissu laticifère et fournissent l'énergie et les sucres nécessaires à la transformation en pyruvate par la glycolyse. Ensuite, le cycle de Krebs qui se déroule dans les mitochondries permet de transformer le pyruvate en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase. Les particules de caoutchouc sont synthétisées à partir des acétyl-CoA comme le précurseur du cis-polyisoprène (caoutchouc) (Archer and Audley, 1987; D'Auzac, 1965) (Fig 1.4). La production, la synthèse et/ou la régénération du latex entre deux saignées, sont donc fortement dépendantes de l'activité photosynthétique des feuilles qui fournit le carbone nécessaire à la synthèse des sucres.



Fig 1.5: Exploitation du caoutchouc en plantation.

En plantation, l'hévéa peut être exploité à partir de la 6^{ème} année lorsque plus de 70 % des arbres de la parcelle ont atteint une circonférence de 50 cm mesurée à 1m au-dessus du sol. Les arbres sont exploités en continu durant 20 à 30 ans, avec cependant des périodes de repos de quelques semaines en saison sèche pendant la phase allant de la chute des feuilles à la refoliation. La saignée est pratiquée tous les 2 à 5 jours (d/2, d/3, d/4, d/5), en demi-spirale descendante de gauche à droite, perpendiculairement à l'orientation des laticifères pour en sectionner le plus grand nombre possible (Fig 1.5). L'application d'un traitement à base d'éthéphon, un générateur d'éthylène, permet de stimuler la production de latex. L'éthylène est une hormone végétale gazeuse suscitant la réponse des plantes aux stress abiotiques, notamment de blessure ; parmi ses différentes fonctions, elle est responsable de l'abscission des feuilles lors de la défoliation. La stimulation éthylénique ne permet pas de dépasser le

potentiel de production de latex permis par le peuplement d'hévéa, mais plutôt de gérer l'intensité d'exploitation en relation avec la fréquence de saignée. Il est ainsi possible de maintenir une production proche de l'optimum tout en réduisant la fréquence de saignée, ce qui permet de diminuer les coûts de main d'œuvre (Abraham et al., 1968; D'Auzac and Ribailier, 1969). Les parcelles de plantation sont abattues vers 30-35 ans. En Asie, le bois d'hévéa est très utilisé pour l'ameublement, ce qui apporte aux planteurs une source de revenu exceptionnelle au moment de l'abattage.

1.1.4.2 Mécanisme du contrôle de l'écoulement de latex

L'écoulement de latex se produit après incision d'une fine couche d'écorce à l'aide d'un couteau de saignée. Dans un premier temps, sous l'effet de la pression de turgescence, les cellules laticifères se vident en partie de leur contenu cytoplasmique (latex). Ensuite un influx d'eau provenant du xylème favorise la poursuite de l'écoulement selon un débit plus lent mais continu. La saignée est souvent effectuée pendant la nuit, au moment où la pression de turgescence est maximale, et parce que la coagulation du latex est retardée par une température fraîche. Quelques heures après la saignée, les particules de caoutchouc coagulent et forment des bouchons entraînant l'arrêt de l'écoulement du latex. Cette coagulation est due à une déstabilisation de la suspension colloïdale du latex par modifications de charge à la surface des particules de caoutchouc, du fait de l'éclatement des lutoïdes. Des contraintes physiques, notamment de pression, exercées aux extrémités sectionnées des vaisseaux laticifères au niveau de l'encoche de saignée provoquent l'éclatement des lutoïdes et libèrent ainsi des éléments (cations, facteurs de coagulations tels que l'hévéine...) induisant des phénomènes de coalescence des particules de caoutchouc (D'Auzac et al., 1995; Delabarre and Serier, 1995; Gidrol et al., 1994; Jacob et al., 1997) (Fig 1.6). Les noyaux et mitochondries sont maintenus à l'intérieur des cellules laticifères lors de l'écoulement du latex et permettent ainsi la régénération du contenu cellulaire en compensation du latex expulsé. Ce phénomène de régénération est accompagné d'un influx d'eau provenant de la sève brute. La disponibilité en eau est donc essentielle à la production de latex, aussi bien pendant l'écoulement que pendant la régénération. La productivité d'un arbre en caoutchouc dépend donc de la pression de turgescence initiale, de la durée de l'écoulement et de la régénération du contenu cellulaire.

Un autre facteur influençant considérablement la productivité en latex est l'état sanitaire du feuillage des arbres, qui peut être gravement altéré par les maladies fongiques des feuilles.

L'activité photosynthétique des feuilles est en effet primordiale car elle fournit le carbone nécessaire à la synthèse des assimilats hydrocarbonés (saccharose) et à l'élaboration du caoutchouc naturel dans le tissu laticifère. Un bon état du feuillage est également indispensable pour la transpiration qui assure les flux d'eau nécessaires au rechargement des laticifères saignés.

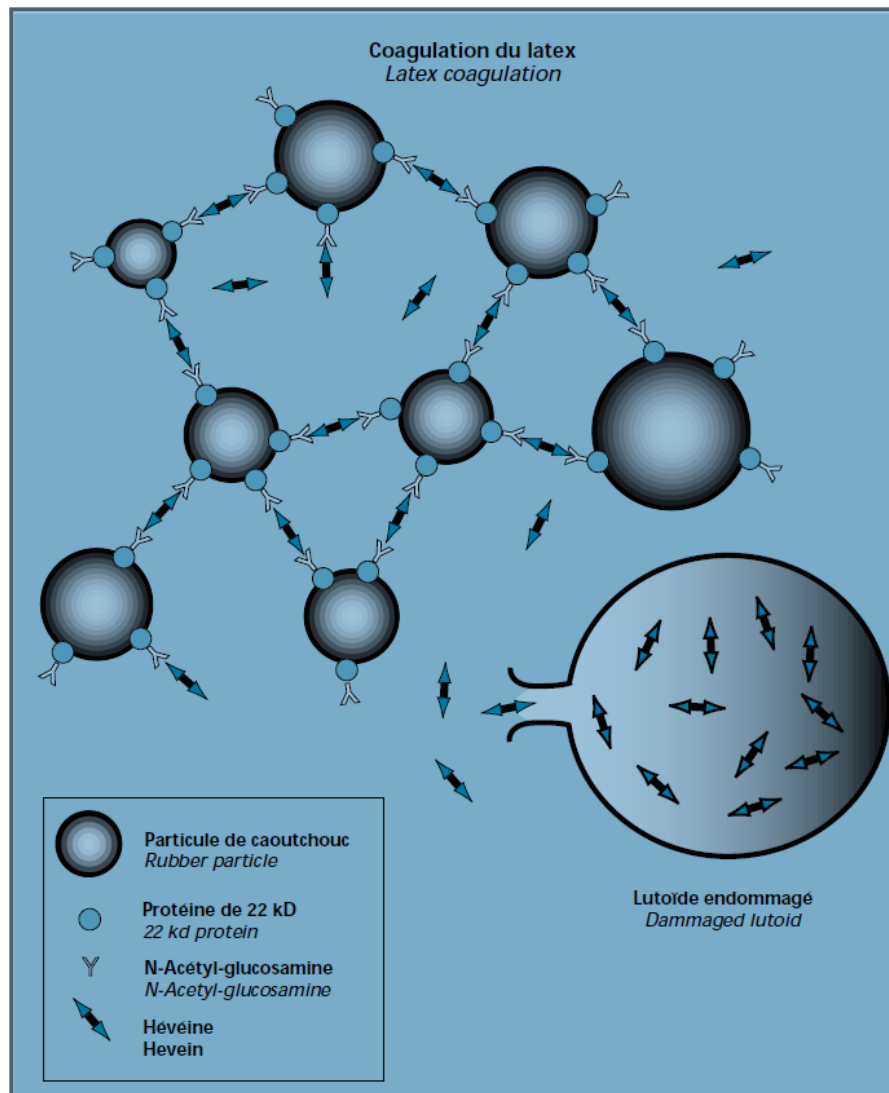


Fig 1.6: Phénomène de la coagulation du latex.

Selon l'hypothèse lectine (Gidrol et al., 1994; Jacob et al., 1997), la coagulation du latex serait contrôlée par au moins quatre protéines, dont deux seraient des facteurs pro-coagulants : l'hévéine, une lectine intralutoïdique et un récepteur d'hévéine glycosylé de 22 kDa localisé sur les particules de caoutchouc. Les deux autres seraient des facteurs anti-coagulants localisés à l'intérieur des lutoïdes : la chitinase et la N-acétyl-D-glucosaminidase, capables d'éliminer la part glycosylée du récepteur d'hévéine.

1.1.5 Les principales maladies fongiques des feuilles chez l'hévéa

Les maladies cryptogamiques des plantes cultivées, responsables de 70 % des pathologies végétales, engendrent d'importantes contraintes sur la production et la qualité des produits agricoles, et constituent donc une difficulté importante pour l'agriculture mondiale.

L'hévéaculture subit également d'importants préjudices causés par des maladies cryptogamiques. On présente ici de façon succincte les principales maladies fongiques des feuilles d'hévéa, à l'exception de celle due à *Corynespora cassiicola*, qui sera décrite de façon détaillée au paragraphe §2.

- *Microcyclus ulei* est un champignon ascomycète responsable de la maladie connue sous le nom de « South American Leaf Blight » (SALB). Alors que l'hévéa est originaire de la forêt amazonienne, cette maladie a considérablement limité le développement de l'hévéaculture dans toute l'Amérique Latine, qui ne représente que 2 % de la production mondiale. Ce champignon représente surtout la principale menace pour l'ensemble de la filière de production du caoutchouc naturel qui serait remise en cause en cas d'introduction accidentelle et de développement en Asie. Tous les clones d'origine Wickham cultivés en Asie et en Afrique sont très sensibles à *Microcyclus*. De nombreuses sources de résistance existent dans les populations amazoniennes, mais ces populations encore très peu sélectionnées ont une production de latex très faible par comparaison avec celle des clones Wickham. Depuis un siècle, de nombreuses tentatives ont cherché à surmonter cette difficulté, avec notamment l'expérience de Ford au Brésil (Weinstein, 1989). Le projet Cirad-Michelin-Brésil vise depuis 1992 l'obtention de clones Wickham x Amazonien durablement tolérants et productifs. Les attaques de SALB provoquent, dès le plus jeune âge des plantations, des défoliations partielles ou totales, de façon répétée pouvant aller jusqu'à la mort des arbres. En condition naturelle, l'infection se produit sur les jeunes feuilles des unités de croissance non encore matures, au stade B (Hallé and Martin, 1968; Le Guen et al., 2008) (Fig 1.7).
- *Collectotrichum gloeosporioides* est communément appelée l'anthracnose des feuilles. Elle sévit à des degrés variables dans toutes les zones d'hévéaculture, avec parfois des pics épidémiques (notamment sur GT1, dans le sud-Cameroun ou à Kalimantan) (Fig 1.7). Les attaques se produisent sur les jeunes feuilles en formation au stade B, généralement lorsque la refoliation annuelle coïncide avec le

début de la saison des pluies. Les clones à refoliation tardive sont donc souvent les plus affectés. Le remplacement de GT1 par PB260 a permis de résorber cette maladie au Gabon

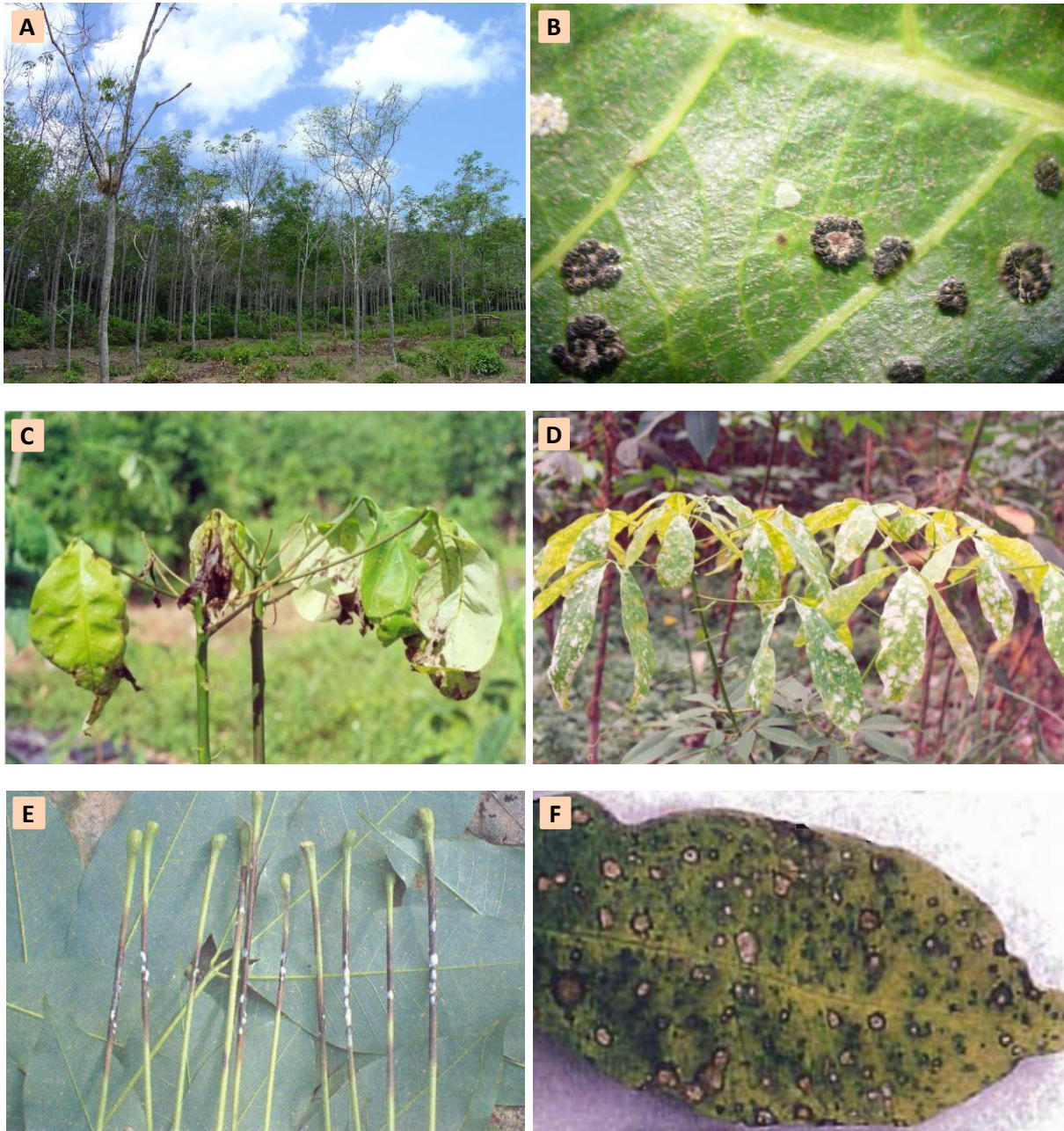


Fig 1.7: Les maladies fongiques des feuilles chez l'hévéa.
(A, B) parcelle défoliée par une attaque de SALB (Guyane) et les stromas sur la face supérieure d'une feuille, **(C)** *Colletotrichum*, **(D)** *Oïdium*, **(E)** *Phytophthora* et **(F)** « bird's eye spot » due à *Helminthosporium heveae*.

- Le mildiou de l'hévéa dû à *Oïdium heveae* s'attaque aux jeunes feuilles au cours de la période de refoliation dans toutes les zones d'hévéaculture, mais il est peu important en Afrique. Les symptômes sont : le développement superficiel du parasite sur les deux faces des feuilles ; les feuilles recroquevillées et recouvertes d'une fine couche de mycélium ; des tâches blanchâtres ou translucides ; la déformation et la chute des jeunes feuilles attaquées (les feuilles attaquées les plus âgées ne tombent pas) (Fig 1.7).
- La maladie *Phytophthora* des feuilles d'hévéa due à *Phytophthora palmivora* provoque aussi des dégâts importants, surtout en Asie. Ce champignon sévit sur toutes les parties aériennes de l'arbre : il attaque surtout les pétioles causant la chute des feuilles entières à maturité complète (foliole rattachée au pétiole), pétiole d'aspect brûlé, avec des traces de latex coagulé sur le point d'attaque ; il provoque la pourriture des fruits qui prennent un aspect noirâtre sur l'arbre. Enfin les attaques peuvent aussi se situer au niveau des panneaux de saignée entraînant la maladie dite des raies noires du tronc (Fig 1.7).
- La maladie « des taches en œil d'oiseau » (bird's eye spot) due à *Helminthosporium heveae* (ou *Dreschlera heveae*) provoque sur les feuilles des lésions nécrotiques circulaires très petites en forme d'œil d'oiseau, d'un aspect gris-blanc ou transparent au centre, et bordées d'une zone marginale jaune. Cette maladie est cependant peu fréquente et affecte peu les arbres. Elle ne fait pas l'objet d'études particulières (Fig 1.7).

1.1.6 Les méthodes de lutte contre les maladies fongiques

Les méthodes de lutte utilisables contre les maladies fongiques foliaires de l'hévéa restent assez limitées, principalement en raison de la nécessité d'appliquer les traitements au moyen de gros engins terrestres ou par avion sur les peuplements de grands arbres. L'application de fongicides en pépinière est efficace, mais en plantation il n'est pas toujours possible de mettre en œuvre l'épandage de fongicides sur des cultures arborées de grande hauteur comme l'hévéa. De plus ce genre de traitement est dangereux pour les ouvriers qui le réalisent et pour l'environnement, et d'une faible durabilité ce qui rend nécessaire leur renouvellement fréquent.

Concernant *Microcyclus* en Amérique latine, seules les régions où les conditions climatiques sont défavorables au champignon ont permis un développement important d'une hévéaculture utilisant des clones Wickham. Le choix de régions adaptées procède donc d'une stratégie d'évitement de la maladie. Ces régions sont souvent relativement froides, comme par exemple les Etats de São Paulo et du Mato Grosso au Brésil, et cette stratégie d'évitement a aussi des conséquences négatives sur la vitesse de croissance et l'âge de mise en saignée des hévéas. La région de la côte pacifique du Guatemala, où les conditions froides dues à l'altitude permettent l'utilisation des clones Wickham, bénéficie par ailleurs de sols volcaniques riches et permet une hévéaculture productive.

Concernant *Colletotrichum*, il a été possible de mettre en œuvre une méthode dite de « défoliation artificielle » et relevant d'une stratégie d'esquive. Cette méthode a été employée principalement contre *Colletotrichum* en Afrique, au Cameroun et au Gabon où le clone GT1, très sensible du fait de sa refoliation naturelle tardive, avait été planté massivement. Elle consiste à provoquer une défoliation précoce des arbres en saison sèche par un épandage aérien de solution diluée d'éthéphon, afin de permettre une refoliation anticipée avant la reprise de la saison des pluies, favorable aux champignons. Les jeunes feuilles, ont alors dépassé le stade jeune (stade B) pendant lequel les feuilles sont les plus sensibles (Guyot et al., 2001).

L'arrachage systématique des clones les plus sensibles à une maladie épidémique est parfois pratiqué, c'est une décision coûteuse et difficile à prendre, mais elle est efficace lorsqu'il existe d'autres clones tolérants comme alternative. L'expérimentation clonale sur les plantations et les recommandations des variétés les mieux adaptées, émises par les services d'aide à l'hévéaculture tiennent évidemment compte des aspects pathologiques en excluant les clones les plus sensibles aux principales maladies dans les régions où ces maladies constituent un problème avéré ou même seulement un risque.

L'amélioration génétique de l'hévéa pour la tolérance aux maladies est une approche de longue durée mais qui permet de remplacer les clones les plus sensibles par des clones tolérants, de réduire ainsi globalement le développement des populations d'inoculum et ainsi de limiter le développement des principales maladies. Au Gabon, le remplacement du clone GT1 par le clone tolérant PB260 a permis de réduire considérablement l'extension de *Colletotrichum* dans ce pays. L'amélioration génétique pour la tolérance aux maladies permet donc de réduire les perturbations de la production de latex et les efforts de lutte sur les

plantations. Sous réserve d'efficacité des clones résistants et de durabilité des résistances, c'est une méthode préventive donc en principe moins coûteuse que la lutte curative contre des maladies déclarées. La diversification clonale à l'échelle d'une grande plantation ou d'une région est une mesure essentielle pour réduire le risque global lié aux épidémies fongiques. Cette diversification constitue également une forme d'expérimentation qui permet de détecter et d'écarter rapidement les clones les plus sensibles aux maladies. Il est prudent de développer un nouveau clone prometteur de façon graduelle, afin de vérifier son impact sur les populations fongiques environnantes.

1.1.7 L'amélioration génétique de l'hévéa

Jusqu'à la fin du XIXe siècle, le caoutchouc naturel provient d'Amérique latine et principalement du Brésil. Il est collecté par les seringueiros sur les hévéas natifs de la forêt amazonienne, selon une économie de cueillette. L'amélioration génétique de l'hévéa débute en Asie après le transfert historique de cette plante par Henry Wickham en 1876. Les premières sélections massales sont pratiquées dans les parcelles de seedlings (arbres issus de graines, et donc non greffés). En Malaisie et en Indonésie (Java et Sumatra), des arbres-mères productifs sont identifiés et leurs graines issues de pollinisation naturelle sont récoltées et utilisées comme semences pour l'établissement de nouvelles parcelles. Ces parcelles de seedlings présentaient une grande variabilité de rendement d'un arbre à l'autre (Dijkman, 1951; Whitby, 1919). La mise au point du greffage chez l'hévéa par Van Helten (1918) a constitué un changement très important pour la suite de la sélection végétative et pour le développement des plantations des élites greffées sous forme de clones. Elle permettait en effet une multiplication de masse et à l'identique d'arbres performants hétérozygotes. Les premiers clones réalisés (clones primaires) sont d'abord obtenus à partir des arbres élites issus de la sélection massale de départ. Certains de ces clones primaires, tels que GT1 et PR107, sont encore cultivés de nos jours. Par la suite, les meilleurs clones connus seront sélectionnés comme parents afin de réaliser par pollinisation manuelle contrôlée des croisements pour l'obtention de familles de pleins-frères au sein desquelles seront détectées les génotypes les plus performants qui seront à l'origine d'une nouvelle génération de clones. L'amélioration génétique de l'hévéa vise l'obtention de clones greffés à la fois performants en termes de vitesse de croissance (pour une mise en saignée précoce) et de production de latex. La sélection pour la production de bois d'hévéa est devenue récemment un nouvel objectif associé à celui de la production de latex. Ces objectifs de sélection nécessitent entre autres une bonne tolérance des clones aux différents stress biotiques et abiotiques auxquels peuvent

être soumises les plantations. Les tolérances aux principales maladies fongiques des feuilles sont donc des critères de sélection importants.

L'amélioration génétique chez l'hévéa a jusqu'ici été pratiquée selon les méthodes de la génétique quantitative, par estimation de valeurs génétiques à partir de mesures phénotypiques. A partir des années 1980, depuis le développement des marqueurs génétiques moléculaires, d'importantes recherches visent à développer des méthodes de sélection assistée par marqueurs pour renforcer l'efficacité de la sélection.

1.1.7.1 Sélection traditionnelle en morphologie chez l'hévéa

L'amélioration génétique de l'hévéa en Asie et en Afrique repose sur l'utilisation de la population dite « Wickham ». En Amérique du Sud et notamment au Brésil, on utilise à la fois la population Wickham (W) et des populations amazoniennes sauvages (A) pour la mise au point de variétés issues de croisements W x A durablement tolérantes au SALB et suffisamment productives pour assurer la rentabilité des plantations.

Après le choix de clones parentaux à partir des sources génétiques Wickham ou Amazonie, une recombinaison génétique est obtenue par pollinisation manuelle et création de familles biparentales (de « plein-frères », ou F1). Des individus élites sont sélectionnés dans chaque famille et multipliés par greffage sur des porte-greffes issus de graines d'hévéa non sélectionnées, permettant ainsi l'obtention de nouveaux clones. Le processus complet de sélection nécessite la mise en place d'essais à petite, moyenne et grande échelle. On distingue essentiellement d'abord une phase de sélection précoce portant sur un grand nombre de génotypes, suivi d'une phase d'étude agronomique approfondie et de longue durée d'un nombre relativement limité de nouveaux clones. Il existe de nombreuses modalités concernant le schéma de sélection de base de l'hévéa. Le schéma présenté ci-après est celui qui est pratiqué au Vietnam (Fig 1.8) :

- Sélection précoce en essai à petite échelle: après la germination des graines issues de croisements contrôlés, chaque plantule représentant un nouveau génotype est multipliée végétativement de façon à disposer d'environ 10 arbres greffés par génotype. Ces arbres sont plantés en champ selon un dispositif expérimental à densité élevée (1.5 x 1.5 m soit 4500 arbres/ha) permettant de contrôler au mieux les sources de variation environnementales dans l'essai. Les critères observés ou mesurés pendant cinq ans sont : des notations de maladie des feuilles (l'absence de

traitement phytosanitaire dans l'essai et la densité élevée favorisent le développement des maladies) et des mesures de croissance et de production. Les nouveaux clones sont comparés avec des clones témoins connus pour leurs principaux caractères agronomiques.

- La sélection de longue durée : d'abord les clones sélectionnés dans l'étape précédente sont clonés et plantés en essais en champ avec 20-30 arbres/clone (essai à moyenne échelle) à densité normale (6 x 3 m). Cet essai sera observé pendant 15-20 ans pour la production, la résistance aux maladies, la vitesse de croissance, et l'adaptation à différentes conditions écologiques (essais multi-sites). Ensuite, les clones sélectionnés seront plantés à densité normale dans des essais à grande échelle comportant 1 ha par clone (555 arbres/ clone). L'étude agronomique des clones dans ces essais dure de 20 à 30 ans.

Au cours des différentes étapes de sélection, on augmente la précision (nombre d'arbres/génotype, donc surface/génotype et durée d'évaluation), et on réduit le nombre de génotypes étudiés de façon à affiner la caractérisation écophysiological des clones. Il faut compter de 20 à 40 ans pour développer un nouveau clone (Fig 1.8) (Clément-Demange et al., 2007; RRIV, 2010). Sur la base des résultats des expérimentations à grande échelle, les clones prometteurs sont recommandés aux planteurs, et des jardins à bois de greffe sont développés pour assurer leur multiplication de masse.

1.1.7.2 Sélection à l'aide des marqueurs chez l'hévéa

Un marqueur génétique est un caractère observable sur les plantes, peu ou pas influencé par l'environnement et présentant donc une héritabilité proche de 1 ou égale à 1. Chez l'hévéa, on a utilisé successivement des marqueurs morphologiques, protéiques (isozymes), et moléculaires (portant directement sur l'observation de l'ADN). On dispose de peu de marqueurs morphologiques chez l'hévéa : on peut reconnaître certains clones en plantation sur différentes caractéristiques et notamment d'après leur architecture générale et leur branchement. Dans les jardins à bois, des techniciens entraînés peuvent également reconnaître certains clones. La morphologie des graines est un moyen assez efficace de reconnaissance des clones, notamment quand on dispose d'une collection de graines de référence, mais cela suppose de disposer d'arbres produisant ces graines.

1. Pollinisation manuelle dans les vergers à graines (1 an)



Clonage par greffage



2. Essai à petite échelle (5 ans)



3. Essai à moyenne échelle (15-20 ans)



4. Essai à grande échelle (20-30 ans)



5. Conservation et multiplication des clones sélectionnés

Fig 1.8: Schéma de la sélection traditionnelle de l'hévéa (RRIV, 2010).

L'étude du déterminisme génétique des caractères agronomiques cibles est une approche dont l'importance ne cesse de croître dans les programmes d'amélioration génétique car elle permet d'accroître notablement l'efficacité et la précision des schémas de sélection par la mise en œuvre de la sélection assistée par marqueurs (SAM). La SAM consiste à utiliser des marqueurs génétiques moléculaires pour prédire la valeur génétique des individus en cours de sélection. En fait, on recherche les marqueurs (*locus*) pour lesquels la ségrégation en terme génétique d'une population en ségrégation d'une famille (plupart de cas F1 chez la plante allogame) est associée au phénotype observé. Ces marqueurs doivent donc être polymorphes au sein de la population étudiée pour construire la carte génétique et ce polymorphisme doit être associé aux variations observées du caractère d'intérêt pour identifier les zones du génome associées à ce caractère (Quantitative Trait *Locus*, QTL). Cette méthode présente des avantages surtout chez les plantes pérennes comme l'hévéa par rapport à la sélection morphologique traditionnelle : plus rapide (quelques jours d'analyse au laboratoire suffisent pour établir un diagnostic de la présence ou l'absence des gènes d'intérêt dans un individu en cours de sélection) ; plus précise, stable, non influencée par les facteurs environnementaux. Les études de cartographie de QTL ont créé la base pour la sélection assistée par marqueurs.

La première évaluation du déterminisme génétique de la résistance de l'hévéa au SALB a été réalisée sur une population F1 issue du croisement entre un clone d'*H. brasiliensis* sensible au SALB et haut producteur en latex (PB260) et un clone résistant peu productif, issu de l'hybridation interspécifique entre *H. brasiliensis* et *H. benthamiana* (RO38), en conditions d'inoculations contrôlées (Lepinasse et al., 2000a) et en conditions naturelles d'infestation (Le Guen et al., 2003). Ces études ont mis en évidence plusieurs locus impliqués dans la résistance du clone RO38, dont un QTL à fort effet se comportant comme un gène majeur de résistance dans certaines conditions.

Suite à la découverte de nouvelles souches de *M. ulei* capables de contourner la résistance totale de RO38, une nouvelle source de résistance a été exploitée (Mattos et al., 2003). Il s'agit de celle du clone MDF180, provenant d'une population d'hévéas sauvages du Pérou. Ce clone présente une résistance partielle caractérisée par une intensité modérée de sporulation conidienne mais sans développement de la phase sexuée du champignon qui n'a jamais été observée sur ce clone quel que soit l'inoculum utilisé. Cette résistance partielle serait non spécifique du fait de son efficacité vis-à-vis de l'ensemble des souches testées. L'analyse du déterminisme génétique de cette résistance à partir du croisement entre les clones PB260 (sensible) et MDF180 (résistant) a permis d'identifier deux gènes majeurs, chacun d'eux

expliquant la résistance à un inoculum donné auxquels viennent s'ajouter les effets d'un à trois QTLs mineurs (Le Guen et al., 2008). Du fait de la durabilité de la résistance de ce clone, ces gènes majeurs ouvrent de nouvelles perspectives en matière de création variétale de clones qui soient à la fois hauts producteurs et résistants au SALB grâce à la sélection assistée par marqueurs.

Actuellement, cette stratégie pourrait donc être envisagée afin de mieux comprendre le déterminisme de la résistance/sensibilité des clones d'hévéa à la maladie CLF causée par le champignon *Corynespora cassiicola* et créer des outils d'aide à la sélection d'individus tolérants.

1.2 La maladie « *Corynespora* Leaf Fall » (CLF)

1.2.1 Manifestations de la maladie dans les plantations d'hévéa

La maladie CLF (« *Corynespora* Leaf Fall ») causée par le champignon *Corynespora cassiicola* est considérée depuis 1985 comme l'une des maladies foliaires les plus importantes chez l'hévéa. Initialement, cette maladie était restreinte aux pépinières, puis elle s'est développée dans les plantations d'Asie et d'Afrique, avec des épidémies périodiques, sporadiques ou sévères, déclenchées probablement par le développement rapide de nouveaux clones très sensibles. La maladie CLF a été détectée pour la première fois sur hévéa en Sierra Leone (Deighton, 1936). Cette maladie a été ensuite observée pour la première fois en Inde en 1958 (Ramakrishnan and Pillay, 1961) où elle a affecté essentiellement les plants en pépinière et de jeunes arbres en champ. Elle a ensuite été observée en 1960 en Malaisie (Newsam, 1960), et en 1966 au Nigeria, notamment sur les clones sensibles NIG 800, 801, 802 et 803 (Awoderu, V.A., 1969), des clones qui sont en fait très peu cultivés. Des occurrences sporadiques sur arbres adultes ont été ensuite rapportées en Inde au cours des années 1975 (George and Edathil, 1980), mais la maladie n'était pas encore considérée comme importante chez l'hévéa. C'est l'épidémie de 1985-1987 au Sri-Lanka, affectant principalement le clone RRIC103 nouvellement développé, qui a provoqué une prise de conscience générale de la gravité potentielle du CLF et l'organisation de nombreuses rencontres scientifiques par l'IRRDB (International Rubber Research and Development Board) visant à faire le point sur l'évolution de cette maladie, présenter les recherches engagées pour préparer des méthodes de lutte, et déterminer les clones les plus sensibles à proscrire. La maladie a ensuite été observée dans de nombreux pays hévéicoles, en Asie et en Afrique. Une partie des informations

présentées ci-après, concernant notamment l'Afrique et l'Indonésie, ne sont pas publiées et proviennent des retours d'expérience de différents agronomes présents sur les plantations et de chercheurs, notamment Gohet et Clément-Demange (Cirad, communications personnelles).

En 1985, la première épidémie sévère de CLF sur plantations matures a donc été rapportée au Sri-Lanka de 1985 à 1987 (Jayasinghe, C K, 1997; Liyanage et al., 1986) principalement sur le clone RRIC103. Ce clone était l'un des clones les plus prometteurs du moment et il avait été recommandé aux planteurs à partir de 1978 par l'Institut de Recherche sur le Caoutchouc du Sri-Lanka (RRISL). Il avait été rapidement adopté et représentait 2.2% (4 500 ha) de la superficie hévéicole du pays. L'épidémie de CLF a débuté en 1985 et s'est répandue à toute la zone humide du Sri-Lanka pendant deux ans. En 1987 plus de 4 000 ha de plantations étaient affectés (Liyanage, A de S., et al., 1989). Le RRISL a alors imposé administrativement la destruction totale du clone RRIC103 afin de réduire la population d'inoculum et protéger les autres plantations, ce qui a nécessité une indemnisation des planteurs. Un autre clone, RRIC52 (parent maternel de RRIC103), s'était également montré très sensible pendant cette période. Ce clone RRIC103 avait fait l'objet d'un échange international et l'arrêt de son utilisation dans tous les pays a alors été demandé par l'IRRDB.

En Inde, la première épidémie de CLF a été observée au sud du Karnataka au cours de l'année 1996 (Rajalakshmi and Kothandaraman, 1996). En 1998, 10 000 ha d'hévéas ont été traités chimiquement pour tenter de contrôler la maladie. Le clone RRII105, cultivé sur plus de 60 % des surfaces dans la région sud de l'Inde (Kerala, Karnataka) qui représente 90 % de l'hévéaculture de ce pays, a été particulièrement affecté par cette épidémie (Idicula et al., 2000).

En Indonésie, CLF a été observée pour la première fois en 1980 au sud de Sumatra (Soepena, H., 1983). Plus tard, la maladie a été détectée à Java (Soepena, H., 1986), à Lampung en 1992, à Kalimantan en 1994 et dans la plupart des principales régions hévéicoles. Au cours des années 1980, CLF a sévèrement attaqué une surface totale de 1 200 ha dont 400 ha ont été arrachés, provoquant d'importantes pertes économiques (Sinulingga, W. and Soepena, FH., 1996). De 1998 à 2003, une épidémie a sévi dans le nord de Sumatra sur de grandes plantations où le clone PB260 représentait plus de 30 % des surfaces cultivées. Un grand nombre de clones étaient touchés, dont PB260 mais aussi IRCA111, IRCA230, IRCA18, RRIM712 mais pas les clones RRIC100 ni RRIM921 qui montraient au contraire une remarquable résistance.

En Thaïlande, l'incidence de la maladie CLF a été observée pour la première fois en 1985 (Kajornchaikul, P., 1987), sur les clones RRIC103 et KRS21. Dès 1999, la maladie était présente dans toutes les zones de l'hévéaculture en Thaïlande et les clones les plus sensibles étaient Songkhla6, PR255, PR305 et RRIT251 (Chanruang, N., 2000). Il faut noter que la Thaïlande est le premier producteur mondial de caoutchouc naturel, avec deux millions d'hectares de plantations concentrées principalement dans la péninsule sud qui constitue une immense forêt d'hévéas, et avec une prédominance du clone RRIM600 (plus de 60 % des surfaces). Le climat chaud et humide de cette région est plus propice au développement de *Corynespora* que les régions situées plus au nord. Ces conditions seraient donc a priori prédisposées pour le déclenchement d'épidémies sévères, mais les informations disponibles ne signalent pas cela. Le clone RRIM600, bien que donné sensible par plusieurs sources, pourrait donc avoir opposé une bonne résistance à l'inoculum local. Pourtant ce clone a été signalé comme très affecté par les épidémies survenues en Malaisie et à Sumatra, et assez sensible au Ghana.

Au Vietnam, la maladie CLF a été détectée pour la première fois en 1999 (Dung and Hoan, 2000). Dix ans plus tard, en 2009, la première épidémie a détruit près de 2000 ha, touchant principalement les clones RRIV2, RRIV3 et RRIV4 qui étaient en développement rapide.

En Chine, la maladie CLF a été identifiée en 2006 chez l'hévéa avec les symptômes spécifiques de brunissement des nervures en pépinière (Jinji et al., 2007). On peut penser que les conditions climatiques froides des régions de ce pays où l'hévéaculture est pratiquée sont peu favorables au développement du champignon.

En Afrique, les plantations du sud-est du Cameroun ont été les premières confrontées à *Corynespora*. Sur la plantation Hevecam, la maladie CLF a d'abord été observée en 1986 dans un champ de clone sur le clone RRIC103 qui a été éradiqué, en conformité avec la demande de l'IRRDB. Puis une épidémie a éclaté à partir de 1989 sur un bloc de 600 ha du clone PB260 causant 50 % de défoliation. Ce clone tolérant à *Colletotrichum* était développé rapidement à cette époque sur cette plantation qui avait subi de très fortes épidémies de *Colletotrichum* sur GT1, clone représentant 60 % des surfaces de la plantation. Dans un autre champ de clones de cette plantation, le clone IRCA18 était affecté mais pas RRIC100. L'épidémie a régressé, apparemment spontanément, à partir de 1992. L'ouest du pays ne semblait pas affecté par CLF, tout comme l'Afrique de l'ouest dans son ensemble où la seule

maladie de feuilles notable, *Colletotrichum*, ne provoquait qu'assez rarement des attaques significatives dans les plantations.

Au Gabon, CLF n'a pour l'instant pas provoqué d'épidémie, malgré le remplacement de GT1 sensible à *Colletotrichum* mais résistant à *Corynespora* par PB260 résistant à *Colletotrichum* mais sensible à *Corynespora*.

En Côte d'Ivoire, le clone RRIC103 présent seulement dans un champ de clones depuis 1980 avait été maintenu et observé attentivement à partir de 1985. Quelques rares symptômes ont été observés sur quelques feuilles tombées au sol, mais la canopée du clone est toujours restée saine de 1985 à 2000. En 1989, de premières observations d'attaques ont été faites sur le clone RRIC110, et une attaque violente est survenue en 1990 sur ce clone qui n'était cultivé que dans quelques blocs monoclonaux. Ce clone a alors été systématiquement arraché. Par ailleurs, des observations d'une maladie du feuillage non identifiée ont été faites en 1992 sur les clones IRCA18 et IRCA22 dans un champ de clone planté en 1981, donc depuis le sol sur des arbres de plus de 20 mètres de hauteur.

Au Nigéria, en 1994 et 1995, une violente attaque touche le clone supposé RRIC121 dans un champ de clones de la plantation d'Utagba Uno (Delta State). L'attaque se manifeste par un jaunissement rapide de l'ensemble du feuillage et une défoliation totale. Les feuilles au sol portent les symptômes en arête de poisson caractéristiques de *Corynespora*. Des investigations ultérieures montreront que l'identité réelle de ce clone était RRIC103. Il semble que ce clone a été introduit et diffusé en Afrique par erreur sous le nom de RRIC121. En septembre 2000, une épidémie est signalée au Nigéria sur la plantation d'Osse River (Udo State). Elle touche très violemment le clone IRCA18 en plein développement, et à un moindre degré les clones PB260 et PB217. Le clone RRIC100 montre une excellente résistance. Au cours des années suivantes, la maladie se développe sur la plantation d'Araromi, toujours principalement sur le clone IRCA18. Quelques blocs supposés du clone RRIM703 montrent un phénomène d'attaque violente distribuée de façon dispersée sur environ 50 % des arbres, les autres arbres restant sains. Les investigations montreront qu'une erreur de multiplication végétative avait conduit à mélanger dans ces blocs les clones RRIM703 (sain) et RRIC103 (malade) ; on peut supposer que la similitude des deux noms a causé l'erreur. Pourtant, RRIM703 avait été jugé très sensible sur les plantations de Socfindo au nord-Sumatra pendant l'épidémie de 1998-2003. Dans ces plantations, la maladie CLF a également violemment affecté toutes les parcelles d'expérimentation du clone PB260 issu d'embryogenèse somatique secondaire.

Au Ghana, la maladie CLF est observée sur la plantation Grel à partir de 2003 et avec un caractère épidémique à partir de 2005 toujours principalement sur le clone IRCA18, mais aussi sur PB260, PB217, et RRIM600 à un moindre degré. A partir de 2011, dans un champ de clones planté en 2007, on observe également une très forte sensibilité des clones IRCA427 et IRCA631. Dans un champ de clones planté en 2010 avec une ligne témoin de IRCA18, on a observé une attaque modérée sur cette ligne d'IRCA18 lors de la refoliation en 2015, puis une attaque violente mais de faible durée (deux mois suivant la refoliation en avril-mai) en 2016. Les autres clones affectés significativement dans cet essai en 2016 étaient PB217 et CDC56.

En Côte d'Ivoire, la maladie CLF est signalée en 2008 sur le clone IRCA18 dans la plantation d'Elaeis. A partir de 2009, une épidémie générale affecte les parcelles d'IRCA18 dans presque toutes les plantations du pays. L'impact économique est particulièrement douloureux pour les petits planteurs villageois qui avaient participé au développement rapide de ce clone et dont la totalité de la plantation était parfois constituée de ce seul clone. Sur la plantation SOGB, la forte sensibilité du clone IRCA631 est confirmée. Depuis l'arrachage des parcelles infectées d'IRCA18 et IRCA631 (environ 250 ha), il ne reste plus à la SOGB qu'une parcelle affectée par *Corynespora* (clone RRIM802). Dans les jardins à bois de greffe de cette plantation, on a observé d'importants symptômes en arête de poisson caractéristiques de la maladie CLF sur les clones CDC56 et FDR5597.

Au Liberia, la première épidémie de la maladie CLF a lieu en 2010, toujours presque exclusivement sur le clone IRCA18. L'arrachage des parcelles infectées a produit la régression de la maladie. Il faut noter qu'on a évité de planter IRCA18 au Cameroun dès les premières alertes de sensibilité de ce clone à *Corynespora*. Le développement de PB260 a également été interrompu. Et aucune nouvelle épidémie de CLF n'a été signalée dans ce pays depuis 1993.

En Amérique du sud où l'hévéaculture est principalement confrontée à la maladie sud-américaine des feuilles due au champignon *Microcyclus*, *Corynespora* n'a été détecté que sous forme endophytique dans des feuilles asymptomatiques, et la maladie CLF n'a jamais été observé en plantations. Cela peut être dû à une présence de l'hévéaculture relativement peu importante en superficie et principalement localisée dans des régions climatiques assez froides afin d'éviter une confrontation avec *Microcyclus*. Les conditions climatiques de ces régions sont également peu propices au développement du champignon *Corynespora*. Dans les

régions favorables au développement de *Microcyclus*, on observe parfois également de fortes attaques de *Colletotrichum* mais pas de *Corynespora* jusqu'à maintenant.

Les observations des épidémies réalisées par les agronomes Cirad en Afrique et en Indonésie indiquent que les attaques semblent ne jamais se produire pendant les premières années de plantation mais seulement à partir de 4 ou 5 ans, âge coïncidant souvent avec le moment de la fermeture des canopées et précédant la mise en saignée. On peut supposer que la fermeture des canopées crée un microclimat humide favorisant le développement de *Corynespora*. On a aussi d'abord supposé que la durée des épidémies était limitée aux quelques années suivant cette fermeture des canopées, et que les peuplements d'hévéa acquéraient ensuite une résistance conduisant à la régression de la maladie. Ce phénomène a par exemple été observé au Cameroun sur la plantation d'Hevecam pour le clone PB260, et au nord-Sumatra sur les plantations de Socfindo, Sipef et Goodyear. En revanche, dans le cas des épidémies survenues en Afrique de l'ouest sur le clone IRCA18, ces épidémies n'ont régressé qu'avec l'arrachage ou le traitement des parcelles pendant plusieurs années ; l'arrêt des traitements s'est accompagné d'une reprise de la maladie nécessitant une reprise des traitements. La plupart des parcelles d'IRCA18 âgées de plus de 10 ans au moment des épidémies n'ont pas été affectées ; ce fut le cas notamment sur la plantation de la SOGB à l'ouest de la Côte d'Ivoire. Pourtant, sur une plantation distante d'environ 100 km (Hevego/Scaso) qui n'avait jamais été affectée par la maladie CLF, des parcelles d'IRCA18 âgées de 19 ans ont été violemment attaquées et ont dû être arrachées. Dans cette plantation, on a également noté la forte sensibilité des clones IRCA707 (clone en essai, non cultivé) et PB310. Il semble donc, dans l'état actuel, que lorsqu'une forte sensibilité se manifeste pour des clones déjà plantés, l'arrachage constitue la méthode de lutte la plus efficace. La chronologie des épidémies en Afrique de l'ouest peut laisser supposer une progression géographique de l'épidémie depuis le Nigéria jusqu'au Liberia. Cette chronologie peut aussi être liée à celle du développement du clone IRCA18 dans les plantations qui a probablement pour effet d'amplifier fortement la quantité d'inoculum initialement présente sur les différents sites.

Historiquement, les clones reconnus comme indéniablement très sensibles à la maladie CLF sont FX25, IAN873, IRCA18, IRCA427, IRCA631, KRS21, PB28/59, PB260, RRII105, RRIC103, RRIC110, RRIM725, RRIV2, RRIV3, RRIV4. Les clones reconnus comme très tolérants sont GT1, IRCA41, IRCA331, RRIC100, RRIM921. Il est important de préciser nos connaissances sur les niveaux de sensibilité des principaux clones cultivés et des nouveaux clones issus des projets de sélection, dans le but d'écarter de façon rigoureuse les clones les

plus sensibles. Mais il faut souligner d'une part qu'il est souvent difficile de distinguer les attaques de *Colletotrichum* de celles de *Corynespora*, et d'autre part que l'identité des clones est le plus souvent connue par la documentation des opérations de multiplication végétative, mais fait rarement l'objet de contrôle rigoureux par marqueurs génétiques. Dans l'état actuel des connaissances, on ne peut citer avec certitude de cas où, en situation épidémique, un clone serait très sensible dans une région et très résistant dans une autre (bien que cela ait été évoqué pour le clone GT1).

Le clone RRIC100 mérite une mention particulière. Dans toutes les plantations où il a été confronté à une épidémie, ce clone a montré une remarquable résistance (sud-est Cameroun, nord-Sumatra, Afrique de l'ouest). Pourtant ce clone est apparu sensible lors de tests d'inoculation conidienne par la souche CCP ou de tests de flétrissement de folioles soumises à la toxine de la souche CCP. Il était ainsi 31^{ème} dans un classement de 51 clones du plus résistant au plus sensible (Breton et al., 2000). Selon ces procédures de test, il était particulièrement sensible (ainsi que les clones RRIM805, PB260 et RRIM901) aux souches agressives CCP (Philippines), BCA5 et BCA3 (Cameroun).

Ce descriptif pourrait laisser penser que la maladie CLF est une catastrophe majeure pour l'hévéaculture. Il faut cependant pondérer cette impression en soulignant que des mesures simples (arrachage rapide des parcelles infectées, évitement des clones les plus sensibles, diversification clonale et développement prudentiel des nouveaux clones) ont généralement permis de contenir les épidémies sur des surfaces relativement limitées. Dans de nombreuses régions où des épidémies ont eu lieu, il est parfois difficile de trouver des parcelles malades quand on les recherche. Cependant le risque est présent, et il semble dépendre du développement de nouveaux clones insuffisamment connus pour leur résistance/sensibilité à la maladie CLF. Il est donc important de mettre au point des méthodes d'évaluation des clones fiables et aussi précoces que possible.

1.2.2 Symptomatologie

La maladie CLF provoque en général des lésions foliaires brunes entourées d'un halo jaune, qui s'élargissent de façon irrégulière et affectent préférentiellement les nervures. Le brunissement des nervures produit parfois des symptômes caractéristiques dits en « arête de poisson » (Chee, 1988) (Fig 1.9). Les feuilles immatures fortement infectées deviennent

jaunes sur une partie de leur surface avant de tomber. Les infections peuvent aussi affecter les feuilles matures, les tiges et les pétioles.

Le diagnostic et la notation de la maladie en conditions naturelles sont très difficiles compte tenu de la grande diversité des symptômes attribués à *Corynespora* et de la confusion possible avec d'autres maladies foliaires. Les symptômes spécifiques en « arêtes de poisson » ne sont pas toujours rencontrés et concernent plutôt les feuilles matures, qui résistent mieux. Les lésions, de formes irrégulières, brunâtres ou desséchées au cœur, associées à une légère chlorose périphérique, peuvent ressembler aux symptômes de l'antracnose causés par *Colletotrichum gloeosporioides*. Des symptômes ressemblant à ceux provoqués par *Helminthosporium heveae* ont également été observés. Plusieurs espèces de champignons pathogènes peuvent provoquer la chute des jeunes feuilles et la simple observation visuelle ne permet pas toujours de poser un diagnostic car les symptômes sur jeunes feuilles sont souvent moins caractéristiques.

1.2.3 L'agent pathogène : *Corynespora cassiicola* (généralités)

Corynespora cassiicola (Berk & Curtis) Wei, est un champignon de la classe des ascomycètes, appartenant aux dothideomycètes. Il forme avec *Corynespora smithii* un clade phylogénétique distinct parmi les pléosporaceae (Schoch et al., 2009). Il a été observé sur au moins 389 espèces de plantes tropicales et subtropicales (<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>). Ce champignon infecte également la peau humaine, conduisant à des mycoses (Huang et al., 2009). Seule la forme asexuée (anamorphe) est connue.

Ce champignon pathogène attaque quasiment tous les parties aériennes de la plante (feuille, tige, pétiole, fleur, fruit,...) (Fig 1.9) et cause d'importants dégâts sur de nombreuses plantes d'intérêt économique telles que l'hévéa, la tomate, le concombre, le coton, le soja (Chee, 1990; Koenning et al., 2006; Lakshmanan et al., 1990; Oliveira et al., 2006, 2007; Schlub et al., 2009).

Des isolats de *Corynespora* ont également été obtenus à partir de matériel sain (isolats endophytes) chez le chêne *Quercus ilex* (Collado et al., 1999), chez *Aegle marmelos* (Gond et al., 2007), chez *Magnolia liliifera* (Promputtha et al., 2007), chez d'autres plantes des forêts tropicales (Suryanarayanan et al., 2002, 2011), et chez l'hévéa au Brésil (Déon et al., 2012a). On ne sait pas encore si les isolats endophytes sont distincts des isolats pathogènes, ou bien si les mêmes souches peuvent adopter différents styles de vie en fonction de l'hôte et/ou de l'environnement.

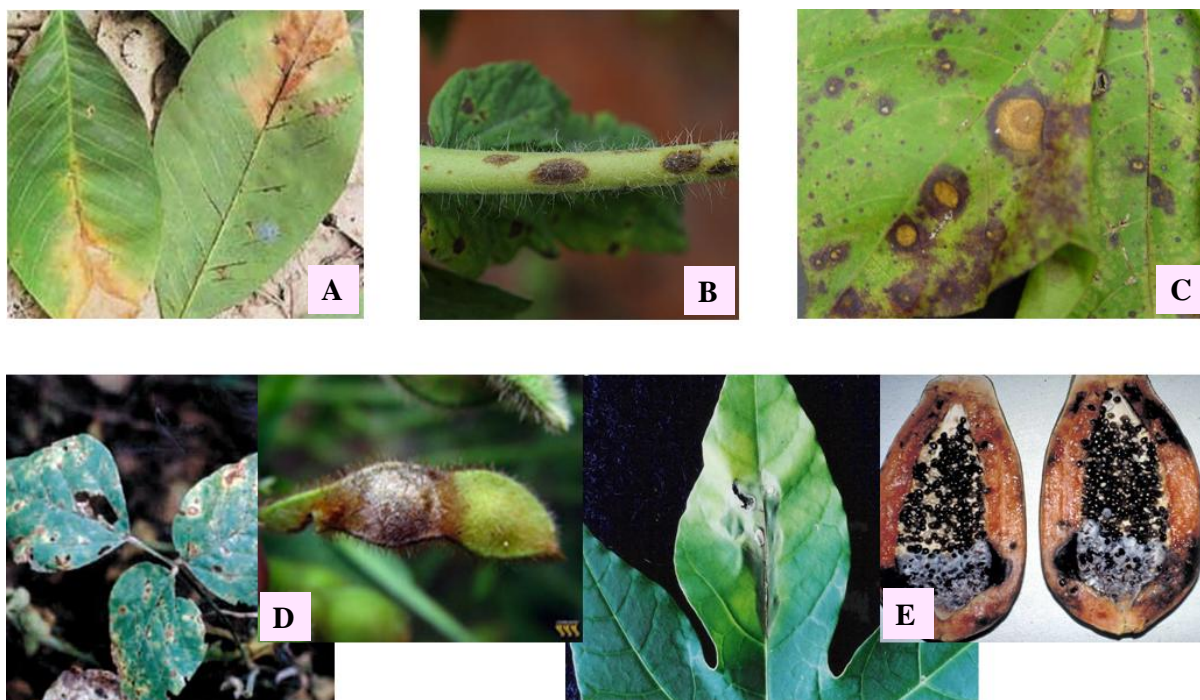


Fig 1.9: Symptômes engendrés par *Corynespora* sur les organes des plantes
 (A) : lésion sur une feuille d'hévéa ; (B) : lésion sur un pétiole de tomate ; (C) : lésion sur une feuille de cotonnier ; (D) : lésion sur une feuille et un fruit du soja ; (E) : lésion sur une feuille et un fruit de papayer.

1.2.4 Condition climatique et processus d'infection chez l'hévéa

En conditions de laboratoire, le champignon se développe facilement sur le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) à une température comprise entre 26 et 30°C et une humidité de plus de 80 %. Après trois jours de culture à l'obscurité, on obtient la germination des conidies. Ensuite, un éclaircissement continu de trois à six jours favorise la sporulation des mycéliums (Chee, 1988). En conditions naturelles, le champignon produit des conidies à partir de 8 h du matin avec un maximum au début de l'après-midi (Chee, 1988; Okhuoya, 1986). Mais la production de conidies varie beaucoup d'une saison sur l'autre et d'une année à l'autre (Radzia et al., 1996). Au Nigeria, on a observé des épidémies de CLF aussi bien en saison humide et en saison sèche. La saison des pluies génère cependant une humidité importante qui favorise la germination des conidies, notamment au moment de la période de refoliation de l'hévéa lorsqu'elle n'est pas achevée en fin de saison sèche et coïncide avec le début de la saison des pluies. Ces conditions favorisent le développement de la maladie. Alors que le stade foliaire sensible pour *Colletotrichum* est strictement limité au stade B, il est important de noter que la période de sensibilité des feuilles d'hévéa à *Corynespora* s'étend du stade B au début du stade D. Cette longue période de sensibilité donne moins de possibilité d'efficacité aux méthodes de lutte par esquivance de la maladie. En saison sèche, les brouillards

matinaux peuvent suffire pour générer l'humidité nécessaire à la germination des conidies sur les jeunes feuilles issues de la refoliation, permettant une infection et l'achèvement du cycle infectieux de *Corynespora*.

Lors de la germination sur les feuilles, les conidies portées par les conidiophores du mycélium développent un ou plusieurs tubes germinatifs à leurs extrémités. Cette matrice fibrillaire associée aux activités hydrolytiques permet de dégrader la cuticule et les parois cellulaires et de pénétrer dans les cellules de feuilles (Chee, 1988). La Fig 1.10 montre, sur une photo de microscopie optique, les conidies et les tubes germinatifs à leurs extrémités, développés sur milieu PDA. Dans le processus d'infection de l'hévéa, cette matrice fibrillaire mycélienne joue un rôle d'adhésion à la surface foliaire et elle est souvent associée à des activités hydrolytiques de cutinases ou pectinases qui détruisent la cuticule ou les parois cellulaires et favorisent la pénétration du mycélium dans les tissus de l'hôte (Chee, 1988). Après la pénétration, le mycélium envahit les cellules des tissus infectés (Garcia, 1997). Chez les clones résistants, l'infection est très limitée ; seules quelques cellules autour du site de pénétration sont touchées (Breton et al., 1997a, 2000). Le test d'inoculation contrôlée de conidies a montré que les premiers symptômes de la maladie apparaissent rapidement, entre 24h et 48h après inoculation selon les clones et les souches. Chez les clones sensibles, l'invasion des tissus est souvent associée à un noircissement des nervures. Ce noircissement se présente parfois sous la forme dite « en arêtes de poisson » (fishbone) ou « en voie de chemin de fer » (railway track) considérée comme un symptôme caractéristique d'une infection par *Corynespora cassiicola*. Il faut remarquer que ce symptôme typique, souvent présenté comme un mode de reconnaissance de *Corynespora*, est observé assez rarement et presque toujours sur des feuilles matures au stade D.

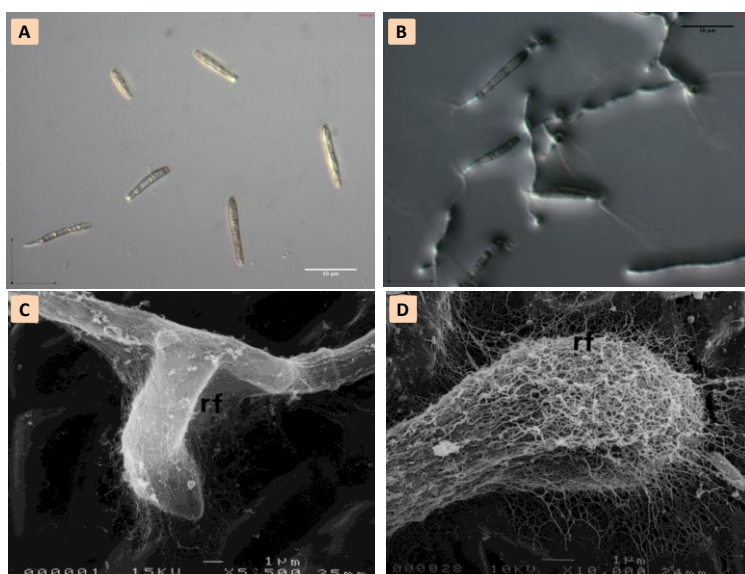


Fig 1.10: Spores du champignon et leur germination.
(A, B) : spores (conidies) et (trait = 50 μ m) et leur germination (C, D) : réseau fibrillaire (rf) de conidie de *Corynespora* (trait = 1 μ m)

1.2.5 Diversité génétique et pouvoir pathogène de *Corynespora*

Une variabilité morphologique est observée à la fois au sein d'une même souche et entre différentes souches de *Corynespora*. Elle porte sur la taille et la couleur des conidies, des différences de texture, de forme ainsi que sur la vitesse de croissance des colonies mycéliennes en culture *in vitro*. Toutefois, cette variabilité ne semble pas corrélée avec le pouvoir pathogène (virulence, agressivité, gamme d'hôte) du champignon (Chee, 1988).

D'après Jayasinghe (2003), la sensibilité des clones d'hévéa à *Corynespora* varie selon les sites géographiques, selon un mode interactif : certains clones sont résistants sur certains sites et sensibles sur d'autres, ce qui laisse supposer l'existence d'une diversité de races de ce champignon, avec des effets d'interaction entre clones et races pour la pathogénicité. Cependant les informations reçues de différentes parties du monde ne sont pas toujours fiables : du fait d'erreurs de manipulation du matériel végétal lors du processus de multiplication végétative, il existe en effet de nombreuses erreurs d'identité génétique concernant les clones d'hévéa. Le contrôle de conformité clonale, visuellement peu fiable, et coûteux quand il fait appel à des outils moléculaires, est rarement réalisé. Par ailleurs, la caractérisation de l'importance des attaques ne suit pas des normes standardisées permettant des comparaisons objectives.

Des études de diversité utilisant des marqueurs génétiques moléculaires ont été menées pour tenter de mettre en relation la diversité génétique du champignon et son pouvoir pathogène. Des études utilisant des marqueurs RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ont montré une corrélation entre certains groupes génétiques et le pouvoir pathogène de différentes souches de ces groupes sur l'hévéa (Atan and Hamid, 2003; Silva et al., 1998, 2003). La technique ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) a permis de classer différents isolats de *Corynespora* en deux clusters présentant des différences en termes de préférences clonales chez l'hévéa (Hashim and Jeyanayagi, 1999; Nghia et al., 2008; Qi et al., 2009). Cependant cette étude était limitée à des souches locales. Une étude de diversité phylogénétique utilisant des marqueurs provenant des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique du champignon et trois marqueurs (*caa5*, *ga4* et *act1*) utilisés par Dixon et al., (2009) a porté sur une large collection de souches de différentes provenances géographiques et de diverses plantes hôtes dont 143 souches provenant de l'hévéa ; elle a montré l'existence de 6 clades corrélés avec la sensibilité de leurs hôtes d'origine. Une étude phylogénétique plus récente (Déon et al., 2014) comportant 70 souches de *Corynespora* provenant de différentes régions du monde, dont 43 isolées sur l'hévéa ainsi que 48 souches

de l'étude de Dixon, a permis de mettre en évidence l'existence de 8 clades qui ne présentaient pas de structuration phylogéographique ni de spécificité d'hôtes bien nettes.

1.2.6 Phytopathologie et réactions de défense chez la plante et chez l'hévéa

1.2.6.1 Phytopathologie des champignons

La phytopathologie des champignons se focalise sur l'étude des interactions entre une plante, un champignon et le milieu environnant, et plus précisément sur l'identification des moyens d'attaque du champignon et des moyens de défense de la plante (Czernic, cours « Interactions plantes-microorganismes pathogènes », Master 1 BFP, UM2). Un champignon pathogène peut avoir un spectre d'espèces végétales hôtes plus ou moins important. Dans la plupart des cas, la plante est non hôte et la rencontre avec le champignon ne produit aucun effet. En phytopathologie, le pouvoir pathogène est défini par une composante qualitative, c'est à dire la capacité d'un pathogène à infecter un hôte donné et à provoquer la maladie, et une composante quantitative, à savoir le degré de dommage engendré à l'hôte par l'infection du pathogène. La virulence pathogène est la composante qualitative (ou spectre d'hôte) et l'agressivité, la composante quantitative. L'infection d'une plante par un pathogène débute en général par des échanges de signaux moléculaires. Deux situations peuvent alors être observées : réaction compatible (le parasite colonise la plante) ou incompatible (la plante stoppe la multiplication du parasite). On peut avoir, de la part de la plante, une résistance non-hôte (incompatibilité entre les deux espèces de la plante et du parasite) ou une résistance hôte pour laquelle on distingue :

- La résistance générale (parfois aussi appelée résistance horizontale mais ce terme fait débat) : polygénique et partielle, cette résistance (ou tolérance) est difficile à sélectionner mais plus stable.
- La résistance spécifique (ou verticale), souvent monogénique et entrant dans le cadre du modèle de Flor, est très efficace et facile à sélectionner mais elle peut être rapidement contournée.

Une épidémie est caractérisée par une infection par un inoculum primaire, suivie de la multiplication de cet inoculum et de sa dissémination. Dans les écosystèmes naturels, on observe généralement des situations d'équilibre entre les populations de plantes et de parasites, accompagnées de phénomènes de co-évolution lente sur le long terme. L'absence de diversité des plantes et des variétés cultivées favorise les épidémies du fait de la

modification de la pression de sélection sur les pathogènes et du développement de mutants virulents. La culture intensive d'une variété sensible, génétiquement homogène, est un facteur important de risque d'épidémie, comme dans le cas de l'hévéa. L'épidémiologie est très importante pour concevoir et développer des méthodes de lutte appropriées. Le diagnostic, fondé sur l'observation des symptômes, est un préalable indispensable au développement de moyens de lutte contre un champignon.

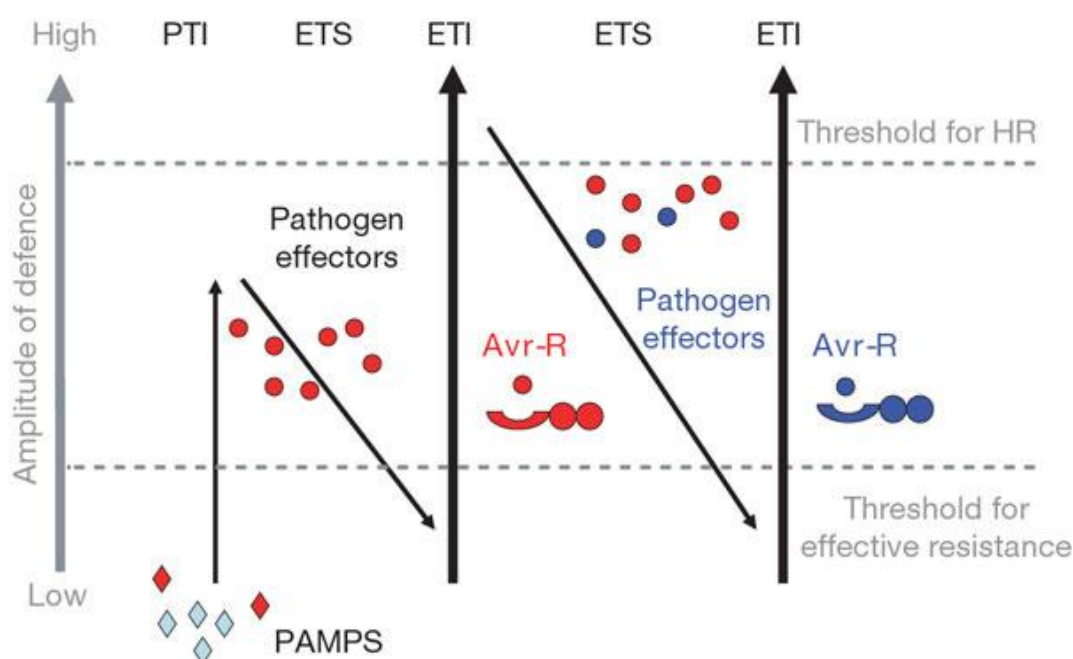


Fig 1.11: Schéma de modèle en zig-zag d'interaction gène pour gène de l'amplitude de défense de la plante vis-à-vis un agent pathogène.

De gauche à droite (évolution de l'interaction): dès le contact avec les tissus de l'hôte, le pathogène produit des PAMPs; la plante les reconnaît et oppose une résistance basale de type PTI pour empêcher le développement du pathogène. Dans une première phase, les agents pathogènes produisent des effecteurs virulents qui interfèrent avec le système immunitaire PTI, la plante devient alors sensible selon la réaction dite ETS (Effector-Triggered Susceptibility). Dans une deuxième phase, un effecteur pathogène donné (en rouge, Avr) est spécifiquement reconnu par une protéine R des cellules de l'hôte entraînant la réaction de défense dite ETI (Effector-Triggered Immunity) associée à une réaction d'hypersensibilité (HR). Dans une troisième phase, les agents pathogènes produisent de nouveaux effecteurs pour interférer avec l'ETI; ces nouveaux effecteurs pathogènes ne sont pas reconnus par la protéine R, et la plante redevient sensible. Enfin, la plante peut développer de nouvelles spécificités de reconnaissance via les protéines R pour déclencher une résistance de type ETI (Flor, 1971; Jones and Dangl, 2006).

1.2.6.2 Immunité chez la plante

En général, la plante utilise deux grands types de système immunitaire naturel contre les stress biotiques et abiotiques (Heil and Land, 2014; Jones and Dangl, 2006; Monaghan and Zipfel,

2012). Le premier implique la perception par des récepteurs membranaires extracellulaires (Pattern-Recognition Receptors ou PRRs), des motifs de molécules associées aux pathogènes (PAMPs ou MAMPs) ou des signaux endogènes associés aux stress abiotiques des cellules d'hôte (DAMPs). Les champignons produisent les PAMPs tels que les oligomères de chitine, de β -glucane et de chitosane ; ces motifs très conservés sont indispensables à la pathogénie ainsi qu'au développement du champignon chez l'hôte. La première phase de reconnaissance entre les PRRs et ces motifs conduit à la signalisation intra-cellulaire et déclenche des changements importants du comportement physiologique des cellules d'hôte qui produisent une résistance basale de type PTI (PAMP-triggered immunity). Plusieurs PAMPs, MAMPs et DAMPs du champignon ont été identifiés et interagissent avec les PRRs de la plante. Ainsi le PAMP xylanase fongique est reconnu par les récepteurs membranaires LRR-RLPs Eix1 et Eix2 chez la tomate (Ron and Avni, 2004) ; la chitine est reconnue par le complexe LysM-RLP CEBiP chez le riz, etc. Au cours du temps, en conditions naturelles, la plante et les pathogènes, se sont adaptés par co-évolution et ont acquis des mécanismes de défense ou d'attaque pour survivre. Cette interaction en zig-zag, de type « gène pour gène », détermine les marges de manoeuvre des possibilités de défense de la plante vis-à-vis d'un agent pathogène (Fig 1.11) (Flor, 1971; Jones and Dangl, 2006). Le champignon produit les effecteurs de virulence pour interférer avec le système immunitaire PTI et la plante devient alors sensible selon une réaction dite ETS (Effector-Triggered Susceptibility). Dans le même temps, la plante a pu développer un deuxième niveau de défense déclenché par une reconnaissance spécifique de ces effecteurs virulents. Les gènes *R* de résistance de la plante codent pour des récepteurs protéiques intracellulaires de type NLR (Nucleotide-binding Leucine-rich Repeat) qui sont capables de reconnaître certains effecteurs produits par les agents pathogènes et entraînent la réaction de défense dite ETI (Effector-Triggered Immunity) (Chisholm et al., 2006; Dangl and Jones, 2001; Dodds and Rathjen, 2010; Jones and Dangl, 2006).

Ces interactions qui déterminent une sensibilité ou une résistance de la plante dépendent des modes de vie des champignons pathogènes, qui peuvent être biotrophes ou nécrotrophes. Pour les champignons biotrophes, le modèle ligand-récepteur proposé par Flor (1971) basé sur le principe de l'interaction gène pour gène, implique une reconnaissance spécifique d'un effecteur (ligand) du pathogène, appelé effecteur d'avirulence, par un récepteur protéique de résistance de la plante. Cette reconnaissance active la signalisation intracellulaire conduisant à la mise en place de la réponse hypersensible HR (Hypersensitive Response), qui correspond à

la mort programmée d'un nombre restreint de cellules autour du site d'infection et bloque ainsi la propagation du champignon. Ce type d'interaction constitue une défense très efficace des plantes contre les champignons biotrophes, mais il favoriserait plutôt le développement des champignons nécrotrophes dont la stratégie est de tuer des tissus en décomposition et de les coloniser selon un mode de sensibilité de type ETS (Effector-Trigged Sensibility) (Friesen et al., 2008).

Chez les champignons biotrophes, les effecteurs sont le plus souvent des protéines appartenant à la classe des Small Secreted Protein (SSP). Pour les champignons nécrotrophes, on trouve de nombreux effecteurs de pathogénie de nature chimique variée, des protéines aux métabolites secondaires.

1.2.6.3 Réactions de l'hévéa vis-à-vis de *Corynespora*

La souche CCP, provenant des Philippines et connue pour sa très grande agressivité chez l'hévéa a été largement utilisée comme souche de référence pour des études histologiques (Garcia, 1997). L'observation des lésions induites par cette souche a montré de nettes différences selon les clones. Après 48 h d'inoculation, le clone GT1 (tolérant) présentait de petites lésions nécrotiques localisées dans quelques cellules entourant la zone d'infection. Un (ou des) composé(s) de couleur naturelle jaune s'accumulaient dans les cellules nécrotiques. Autour de cette zone, les cellules paraissaient saines. L'aspect des noyaux était normal. Pour le clone PB260 (sensible), la plupart des cellules étaient vides et la condensation des noyaux indiquait leur dégénérescence après l'inoculation. De plus, les cellules situées au-delà de la zone nécrotique, sans présence apparente de champignon, étaient en voie de dégénérescence. Ces observations ont permis de supposer l'intervention d'une toxine secrétée par le champignon selon un mode trophique de type nécrotrophe.

Les réactions physiologiques de défense de l'hôte lors du contact avec le champignon ont été étudiées. Après l'attaque du champignon, la plante résistante synthétise de la scopolétine, une phytoalexine de l'hévéa. Cette molécule est produite principalement dans les feuilles (Breton et al., 1997b, 2000). On observe également une augmentation de l'activité des enzymes chitinase, β -1,3-glucanase et peroxydase (guaiacol-oxidase) (Breton et al., 1997a, 1997b). Ces enzymes sont classiquement impliquées dans l'attaque des parois du pathogène et appartiennent à la catégorie des « Pathogenesis Related Proteins » ou PR-protéines.

Récemment, l'étude de Li Boxun et al., (2015) a montré une expression différentielle de gènes de l'hévéa au cours de l'interaction avec *Corynespora* par un génotypage de marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) des ADNc obtenus à partir de feuilles d'hévéa inoculées. Environ 4 800 fragments transcrits ont été détectés (TDF, Transcript-derived Fragments) dont 560 étaient différentiellement exprimés (306 induits en comparaison avec 254 contrôlés en inoculation avec de l'eau). Parmi 159 TDFs clonés et séquencés, 116 présentaient une fonction connue, et quatre gènes de résistance ont été identifiés : *HbNPRJ*, impliqué dans la résistance de l'hévéa à la maladie, est un membre de la famille du gène *NPR* de résistance de la plante ; deux autres, *HbRGH2* et *HbVSP2*, sont impliqués dans la régulation de la résistance du clone IAN873 et de la sensibilité de PR107 ; enfin *HbRGA-1* est un membre de la famille d'un gène analogue de résistance.

1.2.7 La cassiicoline et la diversité des effecteurs de virulence

La présence d'une toxine sécrétée par *Corynespora* dans les filtrats de culture a été mise en évidence (Onesirosan et al., 1975; Breton et al., 1997a, 2000). Cette toxine a été purifiée et caractérisée au niveau moléculaire à partir du filtrat de la souche CCP (Barthe et al., 2007; Breton et al., 2000; de Lamotte et al., 2007) (Fig 1.12). Il s'agit d'une petite glycoprotéine de 27 acides aminés nommée cassiicoline, dont la structure 3D a été caractérisée par résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette protéine induit sur les feuilles d'hévéa des symptômes corrélés positivement avec ceux qui sont générés en inoculation de suspension de conidies sur 51 clones d'hévéa (Breton et al., 2000).

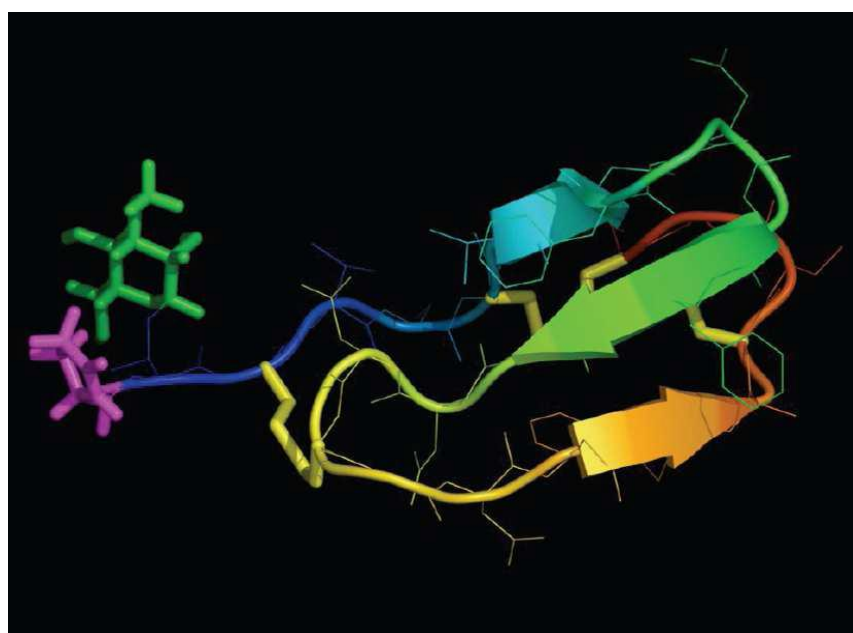


Fig 1.12: Structure tridimensionnelle de la cassiicoline (Barthe et al., 2007).

Une analyse de l'ultrastructure cellulaire des feuilles d'un clone sensible (PB260) a été réalisée par microscopie électronique (Barthe et al., 2007) afin de décrire l'impact de l'exposition à la cassiicoline. Il a pu ainsi être montré que la toxine émise *in situ* et la toxine purifiée exogène induisent des altérations cellulaires comparables, en particulier une plasmolyse importante. Les chloroplastes sont également touchés, montrant une déstructuration des thylakoïdes. Ces altérations pourraient conduire à la mort cellulaire (nécrose) et au flétrissement des tissus foliaires (Fig 1.13).

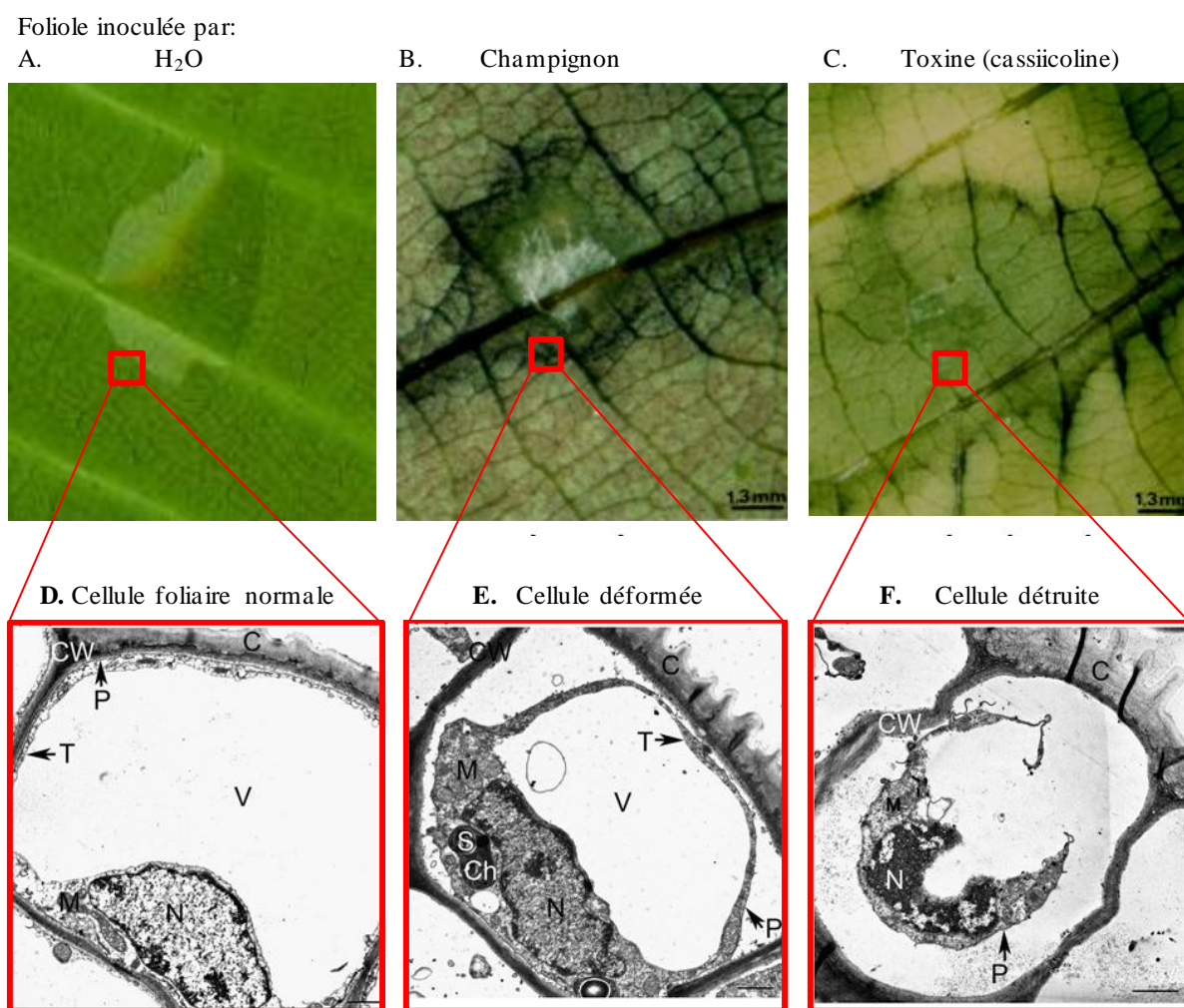


Fig 1.13: Effets de la toxine (Cas1) sur l'ultrastructure cellulaire des feuilles d'hévéa.

Foliole inoculée avec : **A.** eau (témoin) ; **B.** champignon ; **C.** toxine Cas1 purifiée. Les symptômes de noircissement (**B** et **C**) sont démontrés à l'aide de la microscopie électronique en transmission des sections ultra-minces des cellules hors du point d'inoculation affectées (**E** et **F**) par rapport de la cellule normale (**D**). Pour les cellules affectées (**E** et **F**), la plasmolyse est observée conduisant à la rupture de la membrane plasmatique (**P**), du tonoplaste (**T**), la destruction des chloroplastes (**Ch**) (thylakoïdes), de la vacuole (**V**), de la paroi cellulaire (**CW**) et d'autres organes (noyau (**N**), mitochondries (**M**), amidon (**S**).

(Barthe et al., 2007)

Le gène *Cas1* codant pour la cassiicoline au sein des souches CCP et CCAM3 a été identifié et cloné. La comparaison de l'expression de *Cas1* en inoculation CCP sur deux clones, PB260 (sensible) et RRIM600 (tolérant), a montré que le gène s'exprime dans les deux cas. Un pic d'expression de ce gène a été observé 24 à 48 h après inoculation, juste avant l'apparition des premiers symptômes, suggérant un rôle dans la phase précoce de l'infection (Déon et al., 2012a). La régulation transcriptomique du gène *Cas* peut contribuer à la différence de l'agressivité entre deux isolats. En comparant l'expression de *Cas1* en inoculation CCP et CCAM3 sur le clone sensible PB260, on observe que le gène *Cas1* de CCP s'exprime de façon plus importante que celui de CCAM3, ce qui peut expliquer la différence d'agressivité de ces deux souches sur le clone PB260.

Une étude portant sur la détection et le polymorphisme des gènes de cassiicoline a été menée sur une collection de souches de *Corynespora* de différentes origines géographiques, prélevées sur l'hévéa et sur d'autres hôtes : 47 % des souches portaient au moins un gène homologue de *Cassiicoline* (*Cas*), tandis que 53 % des souches en étaient dépourvues. Parmi les souches portant un gène homologue de *Cas*, six isoformes protéiques différentes (*Cas1* à *Cas6*) ont été identifiées par traduction de la séquence nucléotidique détectée, avec parfois 2 isoformes (*Cas2* et *Cas6*) dans une même souche. Ceci nous a permis de classer ces souches en six classes toxiques (*Cas1*, *Cas2*, *Cas3*, *Cas4*, *Cas5* et *Cas2+6*) d'après l'isoforme de cassiicoline détectée. Les souches dépourvues de gène de cassiicoline ont été classées « *Cas0* ». Dans l'analyse phylogénétique de Déon et al. (2014), une bonne relation a été observée entre groupes génétiques et classes toxiques, puisque les souches d'une même classe toxique correspondent à un même groupe génétique, à l'exception de la classe *Cas0* qui est représentée dans tous les groupes génétiques. La typologie proposée par Déon et al., s'appuie à la fois sur le groupe génétique et la classe toxique (type C/*Cas1*, A4/*Cas0*... etc).

Les souches porteuses de l'isoforme de référence *Cas1* sont les plus agressives sur les deux clones testés, PB217 et RRIM600, avec cependant des différences entre souches. Ainsi la souche CCAM3 est moins agressive que la souche CCP sur ces deux clones, bien qu'elles soient du même type (C/*Cas1*). Une différence quantitative d'expression entre ces deux souches lors de l'inoculation (Déon et al., 2012b) pourrait expliquer la différence d'intensité des symptômes. Certaines souches dépourvues de cassiicoline (*Cas0*) sont néanmoins virulentes sur l'hévéa, bien que moins agressives, suggérant l'existence d'autres effecteurs de la maladie. Des souches endophytes (isolées sur feuilles d'hévéa asymptomatiques) ou des

souches prélevées sur d'autres hôtes que l'hévéa (soja, concombre, tomate) peuvent également générer des symptômes sur les feuilles d'hévéa (Déon et al., 2014).

Dans le cas des souches endophytes, les gènes homologues de cassiicoline (*Cas3* et *Cas4*), ne sont pas exprimés lors de l'inoculation de ces souches sur leur clone d'origine, malgré l'apparition de symptômes tardifs. Il a été proposé que ces souches pourraient avoir un développement de type saprophyte (sur feuilles détachées en voie de sénescence) n'impliquant pas la cassiicoline, laquelle serait plutôt impliquée dans le comportement nécrotrophe de souches telles que CCP.

Le génome de la souche CCP a été récemment séquencé et assemblé dans le cadre d'un partenariat entre notre équipe (UMR PIAF/UMR AGAP), le DOE-JGI (« Department of Energy, Joint Genome Institute »), et l'UMR IAM (<http://genome.jgi.doe.gov/Corca1/Corca1.home.html>) (Lopez et al., 2015). Sa taille est de 45 Mb. Il comporte environ 17000 modèles de gènes et 17167 protéines prédites. L'analyse *in silico* du génome a permis d'identifier des effecteurs potentiels parmi lesquels 353 sont différenciellement exprimés lors de l'interaction avec un clone sensible de l'hévéa (PB260) à 12h et 24h par rapport à un témoin constitué uniquement de spores de champignon. Parmi ces effecteurs, 14 sont de type SSP (Small-Secreted Proteins) incluant la cassiicoline (Lopez et al, article en préparation).

Le reséquençage de plusieurs souches choisies d'après l'analyse phylogénétique de Déon et al. (2014) permettra d'avoir une vision plus exhaustive des combinaisons d'effecteurs propres à chaque groupe génétique et/ou de définir plus précisément les pathotypes.

1.2.8 Phénotypage de l'interaction *Hevea* x *Corynespora*

Concernant l'interaction *H. brasiliensis* x *Corynespora*, pour l'instant les études sont limitées par l'absence d'une méthode simple et efficace permettant de quantifier la réponse des clones aux différentes souches et de définir plus précisément les pathotypes (un isolat se distingue par sa virulence et par marqueurs moléculaires uniques) de *Corynespora* (Plank, 1968; Watson, 1970). Le diagnostic et la notation de la maladie en condition naturelle sont très difficiles compte tenu de la grande diversité des symptômes attribués à *Corynespora* et de la confusion possible avec d'autres maladies foliaires. L'apparition sporadique (épidémie) de la maladie est une autre difficulté pour les observations sur le terrain. Plusieurs études ont évalué la sensibilité/tolérance des clones d'hévéa au champ et en pépinière, mais elles sont limitées à

l'inoculum local ce qui rend leur extrapolation peu fiable (Jayasinghe, 2000; Liyanage et al., 1986; Manju et al., 2010). Les expériences d'inoculation en conditions contrôlées sont limitées par la difficulté de combiner à la fois une gamme de clones d'hévéa et un large panel d'isolats représentatifs de la diversité du champignon avec l'origine géographique variée et le risque d'introduire les nouveaux isolats dans les plantations. L'introduction de nouvelles souches, potentiellement pathogènes, pour l'expérimentation dans les pays hévéicoles est strictement interdite.

Une procédure indirecte a donc été proposée, consistant à tester la sensibilité des clones d'hévéas aux exsudats fongiques plutôt que la sensibilité au champignon lui-même (Breton et al., 2000). Dans la procédure initiale, la toxicité a été évaluée soit visuellement par estimation de la zone de nécrose des feuilles, soit par le test de flétrissement foliaire (mesure des pertes d'eau).

En 2012, un nouveau test toxinique a été mis au point dans notre équipe, par Marine Déon, pour phénotyper l'interaction entre des clones d'hévéa et les toxines sécrétées par le champignon *Corynespora*. Il consiste à évaluer l'impact des toxines, toujours sur des folioles détachées, mais cette fois-ci par une mesure de conductivité électrique. Cette méthode a été appliquée dans des études physiologiques de la plante sous l'impact de stress abiotiques tels la salinité chez le riz (Lutts et al., 1996), ou le froid chez l'hévéa (Herbette et al., 2005; Jing; Mai et al., 2009). Cette méthode est justifiée principalement par les études en microscopie qui avaient montré que l'application sur les folioles de toxine purifiée Cas1 ou de filtrats de culture induisait une plasmolyse, révélatrice de fuite d'électrolytes. Le principe du test est donc de quantifier les électrolytes libérés sous l'effet des toxines fongiques. L'utilisation de toxine fongique purifiée ou de filtrats de culture, sans contact avec le champignon vivant, apparaissait donc comme une méthode prometteuse en termes d'efficacité et exempte du risque de disséminer la maladie en milieu naturel. Cette nouvelle méthode de test toxinique avait été mise au point sur des plantes en serre à Clermont-Ferrand et devait donc être développée sur les plantations d'hévéa pour être caractérisée dans le contexte visé par son objectif initial.

1.3 Objectifs de la recherche

Cette recherche s'inscrit dans la perspective de la mise au point d'une procédure de sélection précoce, simple et efficace, permettant de caractériser la réponse à *Corynespora* des

principaux clones d'hévéa déjà cultivés et des clones en cours de sélection. Une telle procédure, dotée d'une bonne valeur prédictive du comportement des clones en conditions normales de plantation, permettrait d'éviter de développer les clones les plus sensibles pouvant favoriser le déclenchement d'épidémies, notamment en Afrique où opèrent les sociétés de plantation qui ont financé cette recherche. Elle serait mise en œuvre dans un projet de sélection financé par les mêmes sociétés. Dans l'état actuel des connaissances, le test toxinique constitue un outil de mesure simple et rapide, pouvant donc s'appliquer à de grandes séries de clones, et pouvant être mis en œuvre sur les plantations sans nécessiter l'introduction d'une quelconque souche du champignon *Corynespora* puisque le traitement appliqué est de nature chimique : toxine purifiée ou filtrat de culture.

Les différentes opérations réalisées dans cette thèse pour tendre vers cet objectif, conduites pour la plupart d'entre elles sur deux plantations de Côte d'Ivoire, sont les suivantes :

- Validation scientifique et technique du test toxinique en termes d'aptitude à caractériser de façon répétable une variabilité de réponse, et développement d'un outil de phénotypage prédictif de la réponse des clones d'hévéa à la maladie CLF. On cherche notamment à préciser certains aspects méthodologiques du test toxinique et à comparer les résultats obtenus par le test toxinique avec ceux qu'on obtient en dehors des plantations (à Montpellier) par inoculation contrôlée de suspensions de conidies du champignon
- Développement sur plantations d'une expérience portant sur une gamme de clones et un ensemble de traitements toxiques afin d'évaluer l'importance de la variabilité observée des effets principaux entre clones et entre traitements toxiques, de déterminer l'importance des interactions, et de produire des résultats pouvant être mis en relation avec ceux de l'expérience déjà réalisée à Clermont-Ferrand par Marine Déon (résultats non encore publiés, données reprises et analysées ici)
- Caractérisation du déterminisme génétique de la réponse de l'hévéa à différents traitements toxiques par détection de QTL. Cette étude a porté sur deux populations d'une descendance F1 issue du croisement PB260 x RRIM600, dont on a d'abord réalisé le génotypage et la cartographie génétique, puis le phénotypage par la méthode du test toxinique. Il a également été possible de tester des notations en essais en champ de la réponse des deux populations à l'inoculum naturel local.

Chapitre 2 - Matériel & Méthodes

2.1 Matériel végétal

2.1.1 Variétés clonales d'hévéa

L'ensemble de 30 variétés clonales utilisées pour cette étude comporte 18 clones cultivés de la population Wickham, un clone d'origine native amazonienne, neuf clones issus de croisements Wickham x Amazonien et deux clones de groupe génétique inconnu (Tab 2-1). Parmi ces 30 clones, onze (CD1174, CDC312, CDC56, FDR4575, FDR5240, FDR5665, FDR5788, FDR5802, PMB1, MDX607 et MDX624) ont été créés dans les années 1950 sur les plantations Firestone du Liberia et du Guatemala, puis sélectionnés au Brésil dans le cadre du programme « Cirad Michelin Selection » au cours des années 1990 ; GT1 est un clone primaire sélectionné en Indonésie ; huit clones (IRCA 18, 19, 145, 230, 303, 331, 41, 631) ont été créés par l'Institut de Recherche sur le Caoutchouc en Côte d'Ivoire ; MDF180 est un clone natif de l'Amazonie péruvienne, sélectionné dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique pour la tolérance à la maladie SALB ; sept clones (PB217, PB254, PB260 ; RRIM600, RRIM802, RRIM901 et RRIM926) ont été sélectionnés en Malaisie ; deux clones RRIC100 et Yunyan77-4 ont été créés au Sri-Lanka et en Chine respectivement. Tous les clones appartiennent à l'espèce *Hevea brasiliensis*, sauf FDR5240 qui est issu du croisement interspécifique *H. brasiliensis* x *H. spruceana*.

Ces clones sont conservés en jardin à bois de greffe en Côte d'Ivoire (plantations SOGB et SAPH-Toupah) et/ou dans des pots en serres (à la température 26/28°C nuit/jour et 40-60 % d'humidité), à Clermont-Ferrand (Université Blaise Pascal) et à Montpellier (CIRAD), en France. Leur conformité clonale a été vérifiée par huit marqueurs microsatellites (SSR) (décrite dans le §2.5).

Tableau 2-1. Clones d'hévéa utilisés dans cette étude.

Groupe génétique: les génotypes W (Wickham) correspondent aux graines historiquement transférées du Brésil au jardin botanique de Kew en Angleterre, par M. Henri Wickham, en 1876, et ensuite améliorées et multipliées en Asie et en Afrique; les génotypes WA ont été créés par croisement entre les génotypes W et A (natif amazonien).

Num	Clone	Croisement (Femelle x Male)	Groupe génétique	Origine
1	CD1174	AVROS1581 x MDF315	WA	Cirad Michelin Selection, Guatemala
2	CDC312	AVROS308 x MDX40	WA	
3	CDC56	MDX91 x RRIM614	?W	
4	FDR4575	HARBEL68 x FDR18	WA	
5	FDR5240	HARBEL68 x TU45/525	WA	
6	FDR5665	HARBEL62 x MDX25	WA	
7	FDR5788	HARBEL8 x MDF180	WA	
8	FDR5802	HARBEL67 x CD47	?	
9	PMB1	? x ?	WA	
10	MDX607	AVROS1581 x MDF?	WA	
11	MDX624	AVROS1581 x MDF?	WA	
12	GT1	Clone primaire	W	Gondang Tapen, Indonesie
13	IRCA18	PB5/51 x RRIM605	W	IRCA, Côte d'Ivoire
14	IRCA19	PB5/51 x RRIM605	W	
15	IRCA145	PB5/51 x RRIM501	W	
16	IRCA230	GT1 x PB5/51	W	
17	IRCA303	GT1 x IR22	W	
18	IRCA331	GT1 x PB217	W	
19	IRCA41	GT1 x PB5/51	W	
20	IRCA631	PB5/51 x RRIM707	W	
21	MDF180	? x ?	A	Pérou
22	PB217	PB5/51 x PB6/9	W	Prang Besar, Malaisie
23	PB254	PB5/51 x PBS/78	W	
24	PB260	PB5/51 x PB49	W	
25	RRIM600	TJIR1 x PB86	W	RRIM, Malaisie
26	RRIM802	RRIM501 x RRIM623	W	
27	RRIM901	PB5/51 x RRIM600	W	
28	RRIM926	PB5/51 x RRIM623	W	
29	RRIC100	RRIC52 x PB86	W	RRIC, Sri Lanka.
30	Yunyan77-4	GT1 x PR107	W	Chine

2.1.2 Population F1 d'une famille biparentale

Une population F1 issue du croisement entre deux génotypes hétérozygotes, PB260 et RRIM600, a été créée au Vietnam par pollinisation manuelle sur une station expérimentale du Rubber Research Institute of Vietnam (RRIV). Le parent utilisé comme femelle, PB260 (origine Prang Besar, Malaisie), issu du croisement PB5/51 x PB49, est l'un des plus cultivés en Asie du Sud-Est pour sa productivité en caoutchouc élevée, mais il est réputé sensible à la maladie CLF. Le parent mâle RRIM600 (origine Rubber Research Institut of Malaysia, Malaisie), issu du croisement TJIR1 x PB86, est le clone qui a été le plus cultivé dans le monde. Il présente une sensibilité au CLF variable selon les environnements. Les quatre grands-parents de cette famille sont non apparentés, ce qui favorise l'hétérozygotie des parents, et donc les possibilités de ségrégation et de détection de QTL. Les graines issues de cette famille PB260 x RRIM600 ont été expédiées en Côte d'Ivoire et mises à germer à la SOGB (Société de Grand Béréby), puis les jeunes plants ont été mis en collection. Ils ont ensuite été multipliés par greffage à raison d'environ 10 répétitions par génotype en moyenne, en vue d'une expérimentation en champ. Deux essais, constitués de deux populations de génotypes différents de la même famille, ont été mis en place sur deux sites au Sud de la Côte d'Ivoire, dans le cadre d'un programme de sélection précoce (Fig 2.1), l'un à la SOGB, l'autre à Toupah sur une plantation du groupe SAPH (Société africaine de plantations d'hévéas) :

- Population plantée à la SOGB (**Pop1**) en 2012 : il comporte 265 génotypes et 5 clones témoins (GT1, PB217, PB235, PB260 et RRIM600), disposés sur une petite colline de 3 ha avec un dispositif de 2,5 x 2,5 m (densité plantée de 1600 arbres/ha). Il y a 11 blocs répartis sur trois panneaux. Les différents arbres greffés de chaque génotype ont été répartis dans les différents blocs, et les arbres d'un même bloc plantés en randomisation. Les blocs ne sont pas tout à fait complets. Les emplacements de bordure ont été plantés avec le clone témoin GT1.
- Population plantée à Toupah (**Pop2**) en 2013 : il comporte 176 génotypes et 5 témoins (RRIC100, GT1, IRCA230, IRCA41 et PB217) disposés sur une superficie presque plane de 2 ha (densité 1600 arbres/ha). Les génotypes ont été disposés aléatoirement dans 18 blocs incomplets. Les emplacements de bordure ont été plantés avec le clone témoin GT1.

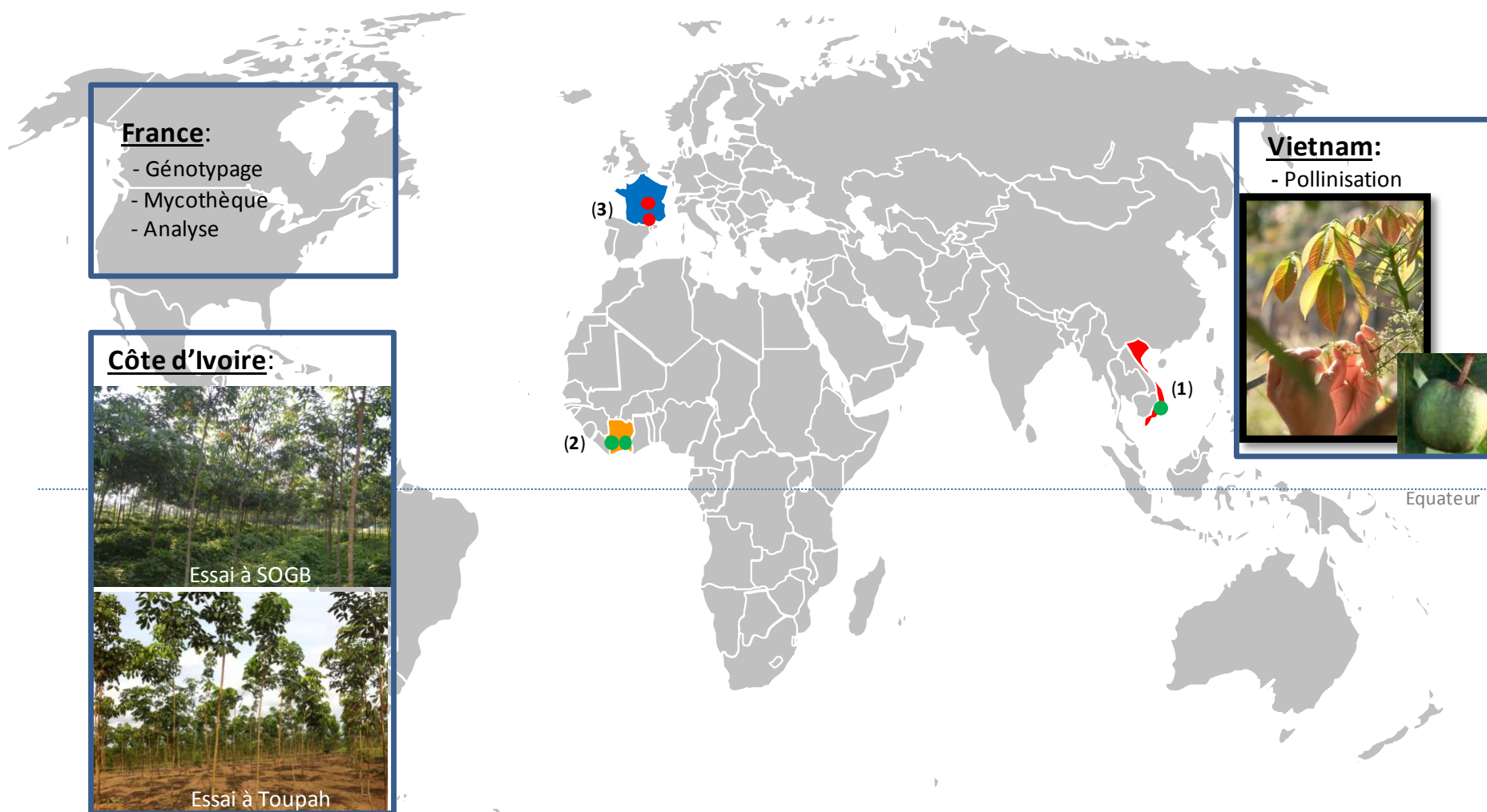


Fig 2.1: Lieux de recherche, des essais en champ dans le cadre de la thèse.

(1) une population F1 issue de la famille PB260 x RRIM600 a été créée au Sud du Vietnam par pollinisation manuelle. (2) deux essais, constitués de deux populations de génotypes différents de cette famille dans le cadre d'un programme de sélection précoce, et les clones d'hévéa (Tab 2-1) ont été plantés sur deux sites (SOGB et Toupah) au Sud de la Côte d'Ivoire. (3) les manipulations au laboratoire (génotypage, isolement, mise au point des tests avec clones d'hévéa en pots en serre) et l'analyse des données sont effectués à Clermont-Ferrand et Montpellier en France.

2.2 Matériel fongique

2.2.1 La collection de souches de *Corynespora cassiicola*

Vingt-six souches de *Corynespora* ont été étudiées durant cette thèse (Tab 2-2). Dix proviennent d'une collection réunie par le CIRAD avant 1998, à partir d'hévéas de différentes provenances géographiques. Deux souches ont été isolées à partir d'autres plantes hôtes (*Cucumis sativus* et *Glycine max*), au Brésil. Deux souches (E55 et E70) ont été isolées à partir de feuilles saines d'hévéa provenant d'une plantation brésilienne et sont considérées comme endophytes (Déon et al., 2012b). Des isollements récents (de 2012 à 2014) ont été effectués à partir de feuilles provenant de différentes plantations d'Afrique de l'Ouest, sur hévéa et papaye (Ribeiro S, Tran D. M., non publié). Enfin, la souche CCP originaire des Philippines, très agressive sur hévéa, a été mutée en laboratoire pour supprimer le gène de cassiicoline (Déon et al, non publié). Elle est nommée CCP*, la mutation pour la délétion du gène *CasI* a été effectuée en remplaçant la région codante (ORF) par la cassette du gène de résistance hygromycin B ; ce remplacement a été fait par recombinaison homologue entre un construit linéaire et le locus génomique cible.

La méthodologie pour l'isolement des souches et pour leur caractérisation moléculaire (définition du groupe génétique et de la classe) est décrite dans le §2.2.2.1).

2.2.2 Méthodologie de l'isolement et de la caractérisation des souches

2.2.2.1 Méthodologie de l'isolement

L'isolement a été effectué sous hotte sur des feuilles semi sèches, le plus rapidement possible après leur prélèvement. On a procédé à une stérilisation superficielle des tissus foliaires par immersion dans l'éthanol 70 % (30 sec), ensuite dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2 % (2 min), puis dans l'éthanol 70 % (30 sec) et un rinçage final à l'eau stérile a été effectué. Des segments foliaires ont été découpés (environ 3 mm²) dans la zone nécrosée (tache noire) et déposés sur le milieu de culture MEA (Malt Extract Agar) ajouté d'acide lactique 0.02 %. La croissance a été conduite à 25 °C à l'obscurité. Dès l'émergence des premiers mycéliums, ceux-ci ont été isolés par repiquage sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) ajouté l'acide lactique 0.02 %. Ensuite, le repiquage a été effectué jusqu'à l'obtention des mycéliums morphologiquement homogènes (couleur, croissance, morphologie mycélienne), suite à l'étape de l'isolement monospore (protocole en Annexe 1).

Tableau 2-2. Caractéristiques des souches de *Corynespora* utilisées dans cette étude.

Les 26 souches utilisées ont été définies pour leur groupe génétique par quatre marqueurs génomiques (ITS, actin, caa5 et ga4) et pour leur classe toxinique par les marqueurs des gènes de cassiicoline (Cas1 à Cas6) (voir §2.2.2.2). Parmi ces souches, 14 ont été caractérisées par Déon (2014) et 11 ont été collectées et caractérisées au cours de la thèse, et la mutante CCP* est une souche CCP mutée en supprimant le gène *Cas1*. Ces souches ont été isolées à partir de feuilles d'hévéa (*H. brasiliensis*), de concombre (*C. sativus*), de papaye (*C. papaya*) et de soja (*G. max*) à l'état malade et sain. Les collectes ont été effectuées à différentes périodes dans plusieurs pays.

Nom des souches	Groupe génétique	Classe	Plante hôte	Etat des feuilles prélevées	Date de l'isolement	Origine géographique	Référence
CGAB3	A3	Cas0	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	<1998	Gabon	Déon 2014
CIND3	A4	Cas0	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	<1998	Inde	Déon 2014
CLN16	A4	Cas0	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	<1998	Malaisie	Déon 2014
CSRI5	A4	Cas0	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	<1998	Sri-lanka	Déon 2014
CTHA3	F1	Cas0	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	<1998	Thaïlande	Déon 2014
CCAM3	C	Cas1	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	<1998	Cameroun	Déon 2014
CCP	C	Cas1	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	<1998	Philippines	Déon 2014
CSB1	B4	Cas5	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	<1998	Malaisie	Déon 2014
CSB16	B4	Cas5	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	<1998	Malaisie	Déon 2014
TSB1	B4	Cas5	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	<1998	Malaisie	Déon 2014
IA	A	Cas2	<i>C. sativus</i>	Malade	<2009	Brésil	Déon 2014
RUD	A	Cas2+6	<i>G. max</i>	Malade	<2009	Brésil	Déon 2014
E55	G	Cas0	<i>H. brasiliensis</i>	Saine	2009	Brésil	Déon 2012b
E70	?	Cas3	<i>H. brasiliensis</i>	Saine	2009	Brésil	Déon 2012b
CCI13	A4	Cas0	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	2012	Côte d'Ivoire	Non publié
CCI6	A4	Cas0	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	2012	Côte d'Ivoire	Non publié
CCI434	A4	Cas0	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	2014	Côte d'Ivoire	Non publié
CCI403	A4	Cas0	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	2014	Côte d'Ivoire	Non publié
CCI405	A4	Cas1	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	2014	Côte d'Ivoire	Non publié
CCI402	A4	Cas2	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	2014	Côte d'Ivoire	Non publié
CCI423	?	Cas4	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	2014	Côte d'Ivoire	Non publié
CCI449	B4	Cas5	<i>C. papaya</i>	Malade	2014	Côte d'Ivoire	Non publié
CCI416	B4	Cas5	<i>C. papaya</i>	Malade	2014	Côte d'Ivoire	Non publié
CNIG404	C	Cas1	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	2014	Nigéria	Non publié
CCI501	C	Cas1	<i>H. brasiliensis</i>	Malade	2015	Côte d'Ivoire	Non publié
CCP*	C	Cas0	Souche mutée		2012*		Non publié

2.2.2.2 Caractérisation des souches

Le genre des souches isolées a été vérifié par séquençage d'amplicons correspondant aux régions intergéniques (ITS1-5.8S-ITS2) des gènes codant pour les ARN ribosomiques, amplifiées avec les amorces ITS1 et ITS4 (White et al., 1990). Le groupe génétique est défini d'après la séquence de quatre fragments génomiques combinés (ITS, actin, *caa5* et *ga4*) (Dixon et al., 2009) et la classe d'après la séquence des gènes de cassiicoline qui peuvent coder pour six isoformes protéiques différentes (*Cas1* à *Cas6*) ; les isolats dépourvus de cassiicoline sont classés *Cas0* (Déon et al., 2014). Le type de chaque souche a été défini par leur groupe génétique et leur classe toxinique.

Les isolats sont cultivés sur milieu PDA pendant 13 jours à l'obscurité à 25 °C. Les mycéliums sont collectés, congelés dans l'azote liquide et lyophilisés. L'ADN génomique a été extrait selon le protocole Risterucci et al. (2000). L'ADN de chaque isolat a été génotypé avec les marqueurs génomiques (ITS, actin, *caa5* et *ga4*) décrits par Dixon (2009) et avec les amorces des gènes codant six isoformes de cassiicoline (*Cas1* à *Cas6*) décrites par Déon (2014). La région de chacun de ces marqueurs a été amplifiée par PCR à partir de 100 ng d'ADN génomique dans 50 µL de mix réactionnel contenant 0.2 µM des amorces, 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1.0 X de tampon PCR et 1 U de Taq (ADN polymérase) (Qbiogen, Illkirch, France). L'amplification de PCR a été réalisée sur 30 cycles, selon les conditions suivantes : 94 °C pendant 45 s, 55 °C pendant 45 s et 72 °C pendant 45 s. Les amplicons produits ont été séquencés par GATC Biotech (Konstanz, Germany). Pour le marqueur ITS (servant à l'identification du genre), les pourcentages de similarité et de couverture de la séquence ont été déterminés par analyse de similarité comparative avec les séquences disponibles dans la database NCBI en utilisant le programme Blastn. Le type de chaque souche a été défini par son groupe génétique et sa classe, selon la classification établie par Déon (2014).

Les souches sont conservées en mycothèque à Clermont-Ferrand et à Montpellier. Pour la conservation à long terme, des « plugs » mycéliens (blocs de 5 mm de diamètre prélevés à partir d'une culture sur milieu PDA additionné d'acide lactique 0.02 %) sont maintenus à -80 °C dans du glycerol à 20 %.

2.3 Le test toxinique

2.3.1 Production des filtrats de culture

Pour produire les filtrats, 100 ml de milieu de culture Czapeck modifié (Tab 2-3) en Erlen de 250 ml ont été inoculés par six plugs mycéliens (5 mm de diamètre) prélevés à partir de cultures sur boîtes (PDA) d'environ une semaine, et incubés pendant 21-26 jours en photopériode de 12h, 25 °C, sans agitation. Ensuite, le milieu a été filtré au travers de papier Whatman pour enlever le mycélium, puis trois fois successivement à l'aide de filtres membranaires Millipore de 0.45 µm, 0.22 µm et 0.22 µm respectivement. La dernière filtration (0.22 µm) est effectuée en conditions stériles. Pour éviter la recontamination en cours d'utilisation, les filtrats sont distribués sous la hotte dans des tubes de 2 mL, scellés avec du film plastique de paraffine et conservés à 4°C.

Tableau 2-3. Milieu de culture Czapeck modifié (Cz)

Produit chimique	Quantité
Saccharose	30 g/L
Acide L-glutamic	2.2 g/L
K ₂ HPO ₄	1 g/L
KCl	0.5 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	36 µM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	35 µM
CuSO ₄ .5H ₂ O	40 µM
pH = 4 avant stérilisation	

2.3.2 Purification de la toxine cassiicoline Cas1 par chromatographie HPLC

La purification de la cassiicoline Cas1 à partir du filtrat de la souche CCP a été effectuée en deux étapes décrites par de Lamotte et al. (2007) ; la première en chromatographie de partage à polarité de phase inversée, et la seconde par perméation de gel, au laboratoire de biochimie de l'Umr AGAP au Cirad (Annexe 2).

La chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée permet de séparer les molécules d'intérêt en fonction de leur hydrophobicité. La phase stationnaire est constituée d'un gel formé de billes de silice greffées de branches hydrocarbonées apolaire (source 15 RPC) qui sont capables de retenir des molécules protéiques apolaires. Les interactions entre

ces billes et les molécules protéiques apolaires vont permettre leur séparation. La phase mobile est constituée d'un solvant polaire qui est un mélange eau/Aceto-Nitrile (ACN). La composition du mélange va varier au cours de l'analyse diminuant la polarité du solvant. Un contre ion TriFluor-Acetate (TFA) permet de rendre les molécules d'intérêt moins polaires et avoir plus d'interaction avec la phase stationnaire.

Composition des tampons : tampons : A (eau + ACN 2 % + TFA 0,065 %) ; tampon B (ACN 100% + TFA 0,065 %). Le tampon B moins polaire sert à décrocher les molécules protéiques de la phase stationnaire. Ces molécules vont passer dans le détecteur UV et absorber à l'UV de 210 nm (peptide) et de 280 nm (Tryptophan, une seule sur cassiicoline). On obtiendra un chromatogramme avec des pics correspondant à la détection des protéines.

La seconde étape de purification de la cassiicoline consiste en une chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne 60 x 1.6 cm remplie d'un gel Superdex 30 qui permet de séparer les molécules dont la masse moléculaire (MM) est comprise entre 1 000 et 20 000 Daltons en fonction de leur masse. Le gel dans ce cas est constitué de grosses billes dextran/Agarose avec un réseau réticulé dans lequel les plus petites molécules vont parcourir un chemin plus important que les grosses et sortiront ainsi plus tard. Il y a une relation entre MM et temps de rétention dans la colonne.

Les fractions sont récupérées dans des tubes par un collecteur de fraction. L'ACN contenu dans les fractions sera évaporé et le TFA neutralisé car il pourrait influencer le test toxinique. On utilisera du tampon Tris-HCl 30mM pH8 pour cette neutralisation. Par la suite, chacune de ces fractions est testée par le test toxinique sur les feuilles détachées au stade C (clone PB217) et maintenues en survie sur papier humide (face supérieure en contact avec le papier), dans une boîte carrée en plastique transparent. Pour chaque fraction, deux gouttes de solution (15 μ L par goutte) sont appliquées sur la face inférieure en deux points diagonaux, après un grattage superficiel pour enlever la cuticule (sur environ 1 mm² de surface) à l'aide d'une lame de scalpel, pour permettre la pénétration des toxines. Ensuite les boîtes carrées sont incubées à l'obscurité à 25 °C. Après une phase d'incubation pendant 48 h à 25 °C, on vérifie la présence de symptôme nécrosé pour trier des solutions toxiques (Annexe 2).

A partir de 1.1 L de filtrat de culture de la souche CCP, on a purifié 852 μ g de toxine Cas1. Cette quantité permet de réaliser environ 28 400 tests s à 5 ng/ μ L.

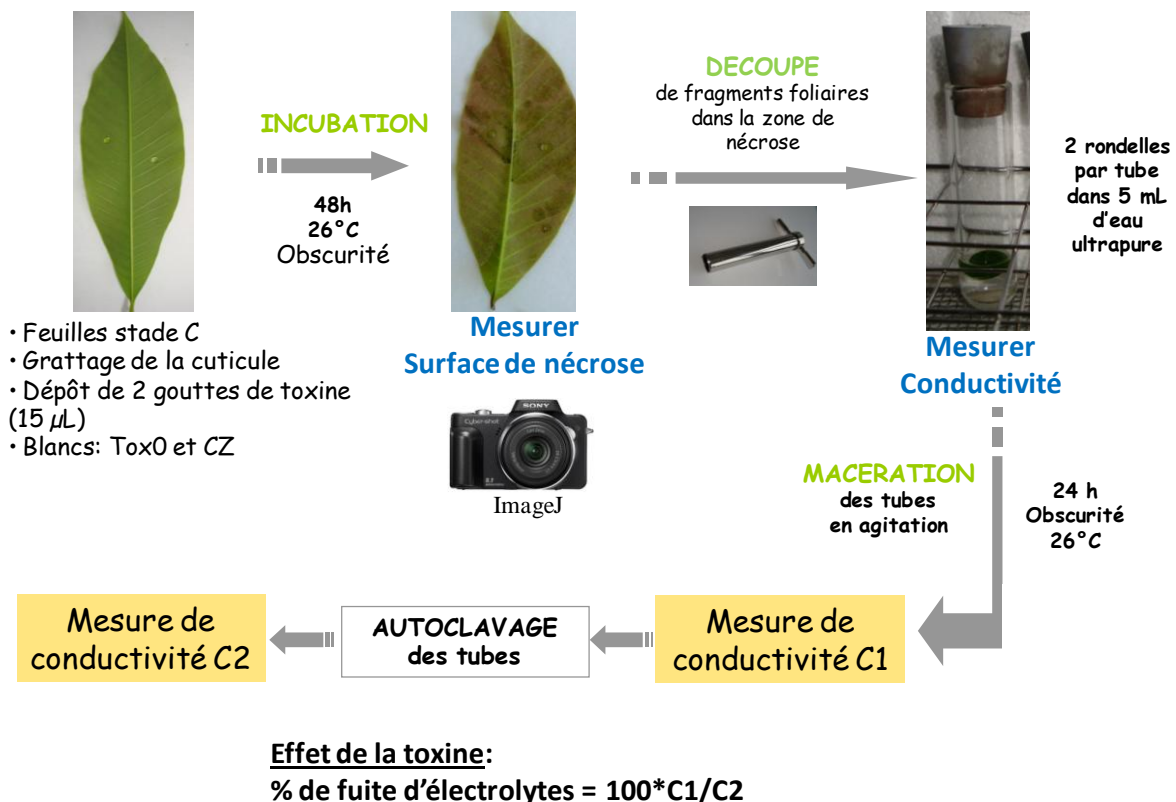


Fig 2.2: Méthode du test toxinique sur feuille détachée.

2.3.3 Méthodologie du test toxinique

Le test toxinique consiste à mesurer la toxicité de solutions (filtrats de culture ou toxine purifiée) sur des folioles détachées (Fig 2.2). Deux méthodes d'analyse ont été comparées dans cette étude : une méthode visuelle (mesure de la surface de nécrose induite) et une méthode basée sur la mesure par conductimétrie des fuites d'électrolytes induites. L'application de cette méthodologie pour évaluer la toxicité des traitements toxiques de *Corynespora* a été mise au point initialement par Marine Déon, sur feuilles détachées de plants d'hévéa cultivés en serre à Clermont-Ferrand (non publié).

Le test est pratiqué sur des feuilles saines prélevées au stade C et maintenues en survie sur papier humide (face supérieure en contact avec le papier), dans une boîte carrée en plastique transparent. Pour chaque traitement, deux gouttes de solution (15 µL par goutte) sont appliquées sur la face inférieure en deux points diagonaux, après un grattage superficiel pour enlever la cuticule (sur environ 1 mm² de surface) à l'aide d'une lame de scalpel, pour permettre la pénétration des toxines. Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité à 25 °C pendant 48h. A l'issue de cette phase d'incubation, une photo de la feuille est réalisée afin

d'évaluer ultérieurement la surface de nécrose induite par le traitement, à l'aide du logiciel ImageJ.

On procède ensuite à la mesure des fuites d'électrolytes : deux rondelles foliaires sont découpées dans la zone nécrosée à l'aide d'un emporte-pièce rond (1.7 cm de diamètre, soit 2.2 cm²) et mises dans un même tube en verre (2.4 cm de diamètre et 10 cm de la longueur) contenant 5 mL d'eau ultrapure. Les faces inférieures de ces deux rondelles doivent être en contact avec l'eau. Après une phase de macération à l'obscurité à 25 °C pendant 24h, on fait alors la première mesure de conductivité C1 par conductimètre 3310 (WTW, Weilheim, Germany) avec la sonde TetraCon ® 325 qui quantifie les électrolytes libérés par la toxine. Puis les tubes sont autoclavés (pendant 15 minutes à 121 °C et 212 kPa) pour faire éclater les cellules et libérer un maximum d'électrolytes. On laisse les tubes sur la paillasse pour refroidir jusqu'à la température ambiante (26 °C). On fait ensuite une deuxième mesure de conductivité C2. Le pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE) dû à l'effet des toxines sur les folioles est le rapport en pourcentage $100 \times C1/C2$.

2.3.4 *Liste des traitements testés*

Nos travaux ont porté sur un total de 31 traitements (Tab 2-4) : trois solutions de la toxine Cas1 purifiée à partir du filtrat de souche CCP (Philippines) (à 1, 5, 10 ng/μL, respectivement Tox1, Tox5 et Tox10) ; 26 filtrats de culture de différentes souches de *Corynespora* ; deux traitements témoins ne contenant ni toxine ni filtrat (milieu de culture Cz et eau Tox0).

Tableau 2-4. Caractéristiques des traitements utilisés dans cette étude.

Les 31 traitements : trois concentrations de la toxine Cas1 purifiée à partir du filtrat de la souche CCP, filtrats de culture de 26 souches de *Corynespora* (Tab 2-2) et deux traitements blancs (Cz et eau Tox0). Le type de souche est défini par le groupe génétique et classe toxinique. La mutante CCP* est une souche CCP mutée en supprimant le gène *Cas1*

Num	Traitements à blanc		
1	Cz	Milieu de culture	
2	Tox0	Eau ultra-pure	
Cassiicoline Cas1 purifiée		Concentration	
3	Tox1	Cas1 à 1 ng/μL	
4	Tox5	Cas1 à 5 ng/μL	
5	Tox10	Cas1 à 10 ng/μL	
Filtrats de <i>Corynespora</i>		Type d'isolat	Origine géographique
6	CCP	C/Cas1	Philippines
7	CCP* (mutant)	C/Cas0	Philippines
8	CNIG404	C/Cas1	Nigéria
9	CCAM3	C/Cas1	Cameroun
10	CCI501	C/Cas1	Côte d'Ivoire
11	CCI405	A4/Cas1	Côte d'Ivoire
12	CCI13	A4/Cas0	Côte d'Ivoire
13	CCI6	A4/Cas0	Côte d'Ivoire
14	CCI434	A4/Cas0	Côte d'Ivoire
15	CCI403	A4/Cas0	Côte d'Ivoire
16	CCI402	A4/Cas2	Côte d'Ivoire
17	CCI449	B4/Cas5	Côte d'Ivoire
18	CCI416	B4/Cas5	Côte d'Ivoire
19	CCI423	CF/Cas4	Côte d'Ivoire
20	CGAB3	A3/Cas0	Gabon
21	CIND3	A4/Cas0	Inde
22	CLN16	A4/Cas0	Malaisie
23	CSB1	B4/Cas5	Malaisie
24	CSB16	B4/Cas5	Malaisie
25	TSB1	B4/Cas5	Malaisie
26	CSRI5	A4/Cas0	Sri-Lanka
27	CTHA3	F1/Cas0	Thaïlande
28	E55	G/Cas0	Brésil
29	E70	?/Cas3	Brésil
30	IA	A/Cas2	Brésil
31	RUD	A/Cas2+6	Brésil

2.4 Test d'inoculation en gouttes conidiennes sur feuilles détachées

2.4.1 Production de la suspension de conidies

L'isolat est cultivé en boîte de Pétri sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) additionné d'acide lactique 0,02%. Pour induire la sporulation, on a appliqué le protocole développé par Chee (1988) avec des modifications pour s'adapter aux conditions disponibles au laboratoire : la croissance mycélienne est effectuée à l'obscurité à 25 °C pendant quatre jours, ensuite les cultures en boîtes de Pétri sont transférées en lumière continue 24/24 (Tube fluorescent Philips, lumière du jour, énergie lumineuse 3100 lux) à 25 °C pendant trois jours. Après cette période, les conidies sont prélevées sous la hotte : on rajoute dans les boîtes de Pétri 20 mL de la solution Tween20 à 0.02 % stérile, on racle bien à l'aide d'une anse de platine, puis la suspension conidienne est filtrée une fois sur un filtre de gaze et récupérée dans un erlenmeyer stérile. La concentration en conidies de la suspension ainsi obtenue est estimée à l'aide d'une cellule de Malassez sous microscope x20. La concentration finale est ajustée à 10^4 conidies/mL avec la solution de Tween20 à 0.02 %.

2.4.2 Inoculation de feuilles détachées en gouttes de suspension conidienne

Des feuilles saines au stade C sont détachées et maintenues en survie dans une grande boîte carrée transparente en plastique en mettant la face supérieure des folioles en contact avec un papier Whatman imbibé d'eau. De six à huit gouttes de suspension à 10^4 conidies /mL (20 µL/goutte) sont déposées sur la face inférieure de chaque foliole. Ensuite, les boîtes sont scellées avec du film plastique de paraffine et mises en incubation à l'obscurité à 25 °C pendant 24h, puis placées en photopériode de 12h, à 25 °C, pendant 72h. Les symptômes sont observés après 4 jours d'inoculation. Pour quantifier l'intensité des symptômes, les folioles inoculées sont photographiées avec une règle, ensuite les photos sont chargées dans le logiciel ImageJ pour mesurer la surface de nécrose (en mm²).

Test de contrôle de germination des conidies : parallèlement à chaque inoculation, le potentiel germinatif de la suspension conidienne est testé sur une lame revêtue d'une mince couche d'agar. Après 12h d'incubation à 25°C en conditions d'humidité saturante, la germination est observée sous microscope x20. Cette méthode a été effectuée sur feuilles détachées de huit clones en serre à Montpellier (GT1, PB260, PB217, IRCA18, IRCA41, IRCA631, RRIC100 et RRIM600), avec deux des souches les plus agressives, CCP (type C/Cas1, Philippines) et CCI13 (type A4/Cas0, Côte d'Ivoire). Ces huit clones ont été choisis pour leur sensibilité

contrastée à la maladie CLF : sur les plantations d'hévéa d'Afrique de l'ouest, GT1 et IRCA41 sont réputés très peu sensibles, tandis que IRCA18 et IRCA631 sont très sensibles. L'isolat CCP a été décrit comme très agressif (Breton et al., 2000; Déon et al., 2014), l'isolat CCI13 est une souche récemment isolée en Côte d'Ivoire et caractérisée dans le type largement distribué A4/Cas0.

2.5 Génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites (SSR)

Dans le cadre de cette thèse, le génotypage à l'aide de marqueurs SSRs a été utilisé pour le test de conformité de clones d'hévéa ainsi que pour la cartographie génétique d'une famille F1 d'hévéa.

Parmi les 494 marqueurs SSRs développés sur hévéa et disponibles au Cirad, 392 ont été caractérisés pour leur polymorphisme chez les deux clones parentaux PB260 et RRIM600 en 2012 par Tran (stage de Master 1). Parmi ces marqueurs SSRs, 300 proviennent de banques d'ADN génomiques enrichies en microsatellites et 92 sont des marqueurs géniques détectés par séquençage d'ADNc provenant d'EST (Expressed Sequence Tags) ou issus d'expériences « SSH » (Suppressive Subtractive Hybridization) (Cubry et al., 2014; Le Guen et al., 2011). Pour chaque marqueur SSR, l'une des deux amorces porte une extension de 19 nucléotides (appelée « queue M13 »), permettant de fixer un fluorochrome lors de la préparation des mix de l'amplification PCR.

Les 392 marqueurs SSRs ont été utilisés pour la construction de deux cartes génétiques de la famille F1 PB260 x RRIM600 (stages de Master 2 de Tran en 2013 et Achour en 2014 réalisés au Cirad). Une carte a été construite à partir de la descendance plantée dans l'essai Pop1 à la SOGB (Tran, 2013) et une autre a été construite à partir des génotypes de la même famille plantés dans l'essai Pop2 à la SAPH-Toupah (Achour, 2014). Au cours de la thèse, le travail a porté sur le regroupement de l'ensemble de la descendance de la famille PB260 x RRIM600 pour la construction d'une carte consensus à partir de deux jeux de données de génotypage. Les trois cartes (deux cartes pour chaque site et une carte consensus) ont ensuite été comparées par l'alignement des marqueurs sur les groupes de liaison.

Pour le test de conformité, huit marqueurs SSR parmi 392 ont été utilisés (Tab 2-5). Ces 8 marqueurs sont situés sur 8 groupes de liaison différents parmi 18 groupes de liaison de la carte génétique de référence de l'hévéa initiée par Lespinasse (2000b), ils sont donc non liés entre eux.

Le génotypage des individus avec marqueurs SSR commence par l'extraction d'ADN. L'ADN génomique des feuilles fraîches d'hévéa a été extrait selon un protocole utilisant le tampon d'extraction MATAB (Risterucci et al., 2000). Le dosage des solutions d'ADN a été effectué par fluorescence (fluorochrome Hoechst 33258). Chaque amplification PCR avec les marqueurs SSR s'est effectuée dans 10 µL de mix réactionnel contenant 25 ng d'ADN, 0.2 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTP, 2mM de MgCl₂, 1.0 X de tampon PCR et 1 U de Taq (ADN polymérase). L'amplification par PCR comporte une étape initiale de dénaturation de l'ADN de 4 mn à 94 °C, suivie par 10 cycles de dénaturation (94 °C pendant 45 s), hybridation des amorces (55 °C pendant 1 mn pour le premier cycle), et élongation des seconds brins (72 °C pendant 1 mn 15^s). Au cours des 10 premiers cycles, la température d'hybridation est réduite progressivement de 0.5 °C par cycle, de 55.0 °C lors du premier cycle jusqu'à 50.5 °C lors du 10^{ème} cycle. Ensuite, 25 cycles sont effectués avec une température d'hybridation de 50 °C (94 °C pendant 45 s pour la dénaturation et 72 °C pendant 1 mn pour l'élongation). Une étape finale d'élongation à 72 °C pendant 5 mn termine la réaction.

Les amplicons ont ensuite été séparés par électrophorèse capillaire sur l'équipement ABI3500xL et les images de migration ont été analysées grâce au logiciel Genemapper (Applied Biosystems 2007).

Tableau 2-5. Présentation des 8 marqueurs utilisés pour le test de conformité (MIsathev).

Les caractéristiques de ces 8 marqueurs peuvent être obtenues par internet grâce à leur code d'accès dans la base de données EMBL/Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Le nombre d'allèles indiqué pour chaque marqueur est celui qu'on observe dans le fichier des profils de référence.

Marqueur SSR	Genbank access n°	Nombre d'allèles	Taille minimum	Taille maximum
M421	AF383935	17	83	121
A31	AF383940	25	124	180
M124	AF221697	21	147	179
MnSod	G73377	25	180	244
T65	AF383942	17	176	210
M574	AF221706	27	211	270
M127	AF221698	16	108	146
A66	AF383941	20	243	281

2.6 Analyse statistique et analyse du déterminisme génétique

2.6.1 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R (version 3.0.3). La normalité des distributions des données a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk (au risque $\alpha = 0.05$). Les analyses de variance des modèles linéaires ont été effectuées avec les packages Rcmdr (pour les effets fixes) et lme4 (pour le modèle mixte avec les effets aléatoires ou/et fixes). La corrélation entre les variables a été calculée par le coefficient de corrélation de Pearson, avec le package Rcmdr.

Pour l'étude de la réponse d'une gamme de clones à différents traitements par le test conductimétrique, les blocs, clones et traitements ont été considérés comme des effets fixes, l'interaction clone x traitement comme des effets aléatoires. Les valeurs moyennes ont été estimées par le package Lsmeans et par le logiciel SAS (procédure Sas-mixed), et la significativité des différences a été vérifiée par le test SNK (Student-Newman-Keuls) au risque $\alpha=0.05$.

La fonction HCPC (Classification Hiérarchique sur Composantes principales) du package FactoMineR intégrée au package Rcmdr a permis de réaliser une classification non supervisée des individus, avec la distance euclidienne (dissimilarité), la méthode d'agrégation « ward » et une troncature automatique. Dans l'article présenté en Annexe 5, un double clustering a été réalisé avec la fonction heatmap.2 du package gplots qui analysait la classification hiérarchique complètement supervisée des individus, en utilisant une méthode d'agrégation « complete linkage ».

Pour les données du phénotypage sur la descendance, le modèle linéaire a été utilisé pour les analyses de variance du caractère. La variance a été décomposée selon les effets expérimentaux que sont l'effet génétique et les effets dus aux facteurs non contrôlés (environnement et/ou erreurs). L'héritabilité au sens large a été calculée par le rapport de la variance génétique (σ_g^2) sur la variance phénotypique : $h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_e^2/n)$, l'héritabilité dépend du nombre de répétitions (n) du génotype (Gallais, 1997), elle varie donc entre 0 et 1.

2.6.2 Cartographie génétique chez l'hévéa

L'établissement d'une carte de liaison génétique nécessite une population de la descendance F1 issue du croisement de deux parents hétérozygotes (c'est le cas de l'hévéa). La cartographie génétique consiste à utiliser l'information de génotypage obtenue sur un grand nombre de marqueurs au sein d'une famille dans le but de constituer des groupes de liaison pour lesquels sont calculés l'ordre et la distance entre les marqueurs. Celle-ci est calculée en fonction du taux de recombinaison observé entre ces marqueurs à l'issue de la méiose chez l'individu parental. Le taux de recombinaison, qui dépend de la fréquence des crossing-over, augmente avec la distance entre les deux locus. L'estimation du taux de recombinaison fournit donc une estimation de la distance entre deux locus. Après avoir génotypé les descendants d'une population pour un ensemble de marqueurs, on teste d'abord les ratios de ségrégation de chaque marqueur afin de détecter les cas de distorsion de ségrégation, puis on étudie tous les couples de locus-marqueurs possibles afin de tester leur liaison génétique en fonction de la distribution des gamètes parentaux et recombinés (de Vienne, 1998). Les écarts aux effectifs théoriques dus à une liaison génétique entre les deux locus ou à une distorsion sur un locus sont testés par le test du χ^2 . Mais les logiciels de cartographie utilisent plutôt la méthode du maximum de vraisemblance et la statistique du LOD score (Logarithm of odds) qui quantifie le degré de liaison génétique (Morton, 1955). Sur la base des liaisons observées, les logiciels de cartographie regroupent d'abord les marqueurs en groupes de liaison, puis ordonnent les marqueurs sur chaque groupe, estiment les taux de recombinaison entre marqueurs adjacents et convertissent ces taux en distances génétiques (en centi Morgan ou cM).

Les cartes génétiques construites chez l'hévéa ont utilisé l'algorithme de régression et la fonction de Kosambi qui, à taux de recombinaison égal, donne des distances plus réduites que la distance de Haldane. Une carte génétique est dite « saturée » quand chaque locus du génome est lié génétiquement à un marqueur. Cela suppose que l'on a trouvé autant de groupes de liaison que de chromosomes sur le génome haploïde de la plante, et que les marqueurs positionnés sur chaque groupe couvrent toute la longueur du groupe de liaison jusqu'à ses deux télomères.

Le génotypage de la descendance F1 de la famille PB260 x RRIM600 avait été effectué par Tran en 2013 pour l'essai Pop1 constitué par 265 génotypes plantés à la SOGB et par Achour en 2014 pour l'essai Pop2 portant 176 génotypes plantés à Toupah. Les cartes génétiques de chaque essai ainsi que la carte consensus des deux essais regroupés ont été réalisées sur le

logiciel JoinMap 4.1 avec l'algorithme de régression, et la distance de Kosambi. Ces cartes seront servies à la détection de QTL.

2.6.3 *La détection de QTL (Quantitative Trait Locus)*

La détection de QTL consiste à détecter le locus (ou groupe de locus) dont la variation allélique est associée à la variation d'un caractère quantitatif. Pour mettre en évidence la présence éventuelle d'un QTL à proximité d'un marqueur, on compare entre elles les valeurs phénotypiques moyennes des groupes d'individus appartenant à une même classe génotypique pour ce marqueur. Si des différences significatives sont observées, on peut inférer la présence à proximité de ce marqueur d'un locus associé à la variation du caractère quantitatif considéré. En effet, puisque les allèles des QTL ne sont pas identifiables (leur position est à priori inconnue), l'information disponible doit venir de marqueurs moléculaires proches (dont les localisations sont connues à partir de la carte génétique). Plus le locus marqueur et le QTL sont proches physiquement, plus ils sont liés génétiquement et plus les différences de valeurs entre classes génotypiques sont importantes. Une fois qu'on a établi une carte génétique saturée, on peut analyser si une ou plusieurs régions de cette carte sont statistiquement corrélées à l'expression d'un caractère d'intérêt. Il faut pour cela disposer d'une mesure fiable de ce caractère sur l'ensemble des individus du croisement étudié ayant servi à établir la carte.

Pour tester la présence de QTL, il y a deux méthodes utilisées dans le logiciel MapQTL (version 6.0) : « Interval Mapping » (IM) pour laquelle le caractère étudié doit avoir une distribution normale et Kruskal-Wallis pour laquelle il n'est pas nécessaire que la distribution soit normale (Lander and Botstein, 1989; Van Ooijen, 2009). La méthode IM détermine pour chaque position dans le génome la probabilité de présence d'un QTL en fonction des informations phénotypique et génotypique aux marqueurs. La méthode utilisée est celle de l'estimation du maximum de vraisemblance et la statistique calculée est le LOD score. Pour chaque position du génome, le maximum de vraisemblance pour la présence d'un QTL est déterminé. En même temps, les effets génotypiques du QTL et la variance des résidus sont calculés. Le génome est scanné sur toute son étendue avec un pas de 1 cM. Une valeur seuil de significativité du LOD score est déterminée par la méthode des permutations (1000 tours) pour chaque caractère étudié. Il est donc possible d'établir pour chaque groupe de liaison une représentation graphique de la valeur du LOD. Un « pic » de LOD score supérieur au seuil de significativité traduit la présence proche d'un QTL participant à l'expression du caractère. Plus ce pic est élevé, plus la participation du QTL à l'expression du caractère est importante.

2.6.4 Analyse des effets alléliques parentaux de QTL

Pour chaque génotype de la population, l'expression de chaque QTL résulte de l'addition des trois effets alléliques suivants: effet allélique maternel, effet allélique paternel et effet d'interaction entre les deux allèles parentaux. Ces effets peuvent être estimés à la position du marqueur le plus proche de la position de QTL sur lequel les constitutions des génotypes de la population sont complètement connues. Si le ratio de ségrégation d'un marqueur est 1:1:1:1 (type de ségrégation <abxcd> ou <efxeg>), l'analyse de variance du caractère phénotypique peut fournir une estimation des effets parentaux (deux allèles par parent équivalant à deux niveaux de traitement), et de l'interaction entre deux parents pour ce caractère. Au locus avec le ratio de ségrégation 1:1 (type <nnxnp> ou >lmxl>), le marqueur est polymorphe sur un seul parent et l'effet allélique peut être testé uniquement pour ce parent. Cette méthode a été utilisée pour évaluer des effets alléliques des QTL détectés pour différents traitements appliqués sur la population. Pour le ratio de ségrégation 1:2:1 ou <hxxhk>, avec les mêmes allèles chez les deux parents, une approche différente est nécessaire : on compare alors les trois classes génotypiques hh, hk et kk afin de tester l'effet de substitution allélique de h par k et d'évaluer l'effet de dominance de la classe hk par rapport à la moyenne des deux hétérozygotes. Cela est fait par une analyse de variance à une voie dont le traitement comporte comme motif les trois classes génotypiques.

Chapitre 3 - Résultats

3.1 Etude méthodologique de certains facteurs d'influence du test toxinique

Le test toxinique par conductimétrie est basé sur la mesure des électrolytes libérés par les tissus foliaires suite à l'application d'exsudats fongiques, que ce soit sous forme de filtrats de culture bruts ou de toxine purifiée. La méthodologie de ce test toxinique a été mise au point initialement par Marine Déon, sur des plants d'hévéa cultivés en serre à Clermont-Ferrand (2013, non publié). Dans le cadre de cette thèse, nous avons d'abord examiné certains aspects méthodologiques avant de développer la méthodologie sur une large gamme de clones, en Côte d'Ivoire. La Fig 3.1 synthétise les différentes étapes du test. Celles ayant fait l'objet d'études méthodologiques spécifiques sont indiquées par les chiffres rouges.

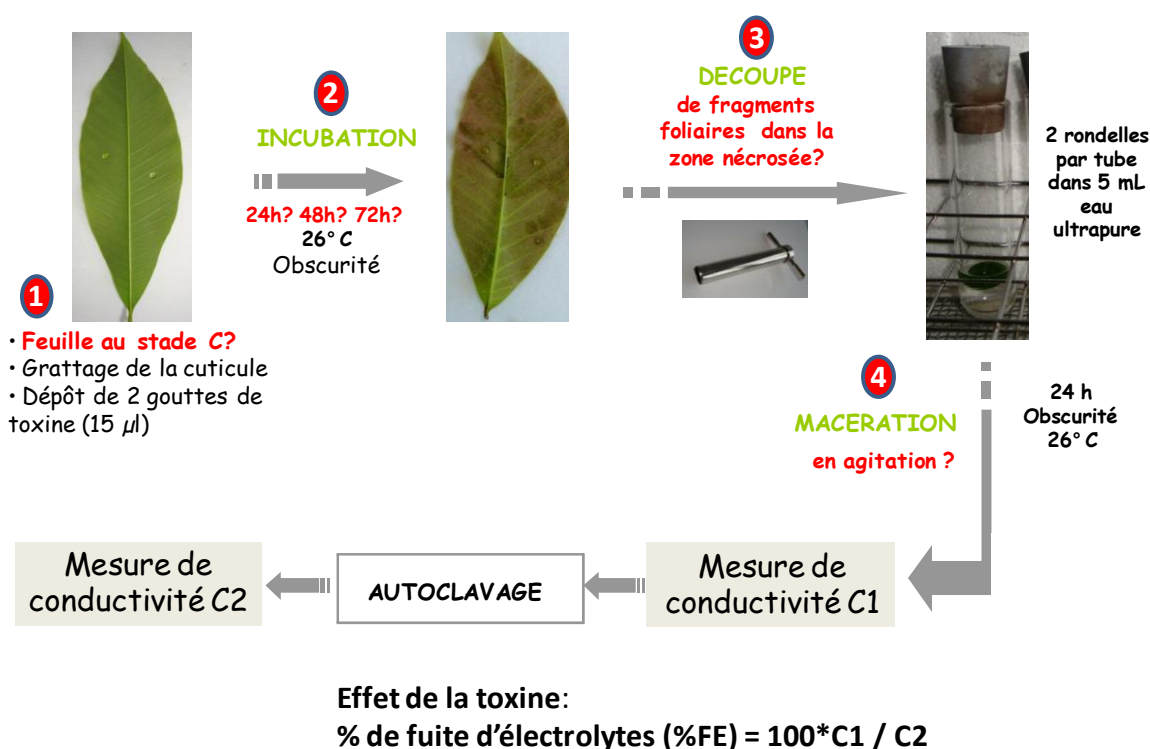


Fig 3.1: Méthodologie du test toxinique

Les paramètres en rouge ont fait l'objet d'une étude spécifique durant cette thèse.

Le test est pratiqué sur des feuilles saines prélevées au stade C (Hallé and Martin, 1968) et maintenues en survie sur papier humide, avec leur face supérieure en contact avec le papier.

Pour chaque traitement, deux gouttes sont appliquées sur la face inférieure en deux points diagonaux, après grattage superficiel de l'épiderme sur environ 1 mm² de surface pour permettre la pénétration des toxines. Après une phase d'incubation, deux rondelles foliaires sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce (1.7 cm de diamètre, soit 2.2 cm²) et mises à macérer dans de l'eau pendant 24h, dans un même tube. On réalise alors une première mesure de conductivité C1 pour mesurer la quantité d'électrolytes libérés dans l'eau par la toxine. Puis les tubes contenant les solutions et les rondelles foliaires sont autoclavés pour provoquer un éclatement de toutes les cellules et libérer la quantité maximale d'électrolytes permise par l'échantillon. On fait ensuite une deuxième mesure de conductivité C2 dans la solution. Le pourcentage de fuite d'électrolytes dû à l'effet des toxines sur les folioles (%FE) est la mesure C1 normalisée par C2 ($100 \times C1/C2$).

Au niveau méthodologique, nous avons examiné l'influence des facteurs suivants : (1) le stade foliaire choisi pour les mesures, (2) la durée d'incubation des feuilles en présence de toxine, (3) la position de la rondelle prélevée, et (4) l'importance de l'agitation lors de la phase de macération. Enfin, (5) la méthode du test toxinique a été comparée avec celle de l'inoculation par une suspension conidienne, sur une gamme de huit clones d'hévéas en serre, avec deux souches très agressives (CCP et CCI13) de *Corynespora*.

3.1.1 Influence du stade foliaire

Le stade de développement foliaire est en général un paramètre important de la sensibilité des plantes aux maladies cryptogamiques. Chez l'hévéa, doté d'une croissance rythmique caractéristique de ce genre, les nouvelles feuilles sont émises périodiquement lors de la formation des d'unités de croissances qui comportent une quinzaine de feuilles. Quatre stades (A, B, C, D) ont été définis pour décrire le développement morphogénétique des feuilles au sein de chaque unité de croissance (Hallé and Martin, 1968). Pour réaliser le test toxinique de manière répétable, il est important de toujours utiliser des folioles au même stade de développement.

Nous avons testé l'influence du stade foliaire sur le clone IRCA631, connu pour sa sensibilité importante à *Corynespora* en conditions naturelles dans les plantations, à partir de plants cultivés en pots, sous serre, à Montpellier. Le plan d'expérience est présenté dans le Tab 3.-1.

Tableau 3-1. Influence du stade foliaire sur les résultats du test toxinique (en %FE).

Plan d'expérience :

- ✓ Clone utilisé : IRCA631. Les stades foliaires testés (B2, C, D et D+), définis d'après Hallé et Martin (1968), sont illustrés par la photo ci-dessous. L'âge foliaire est le nombre de jours depuis le débourrement.
- ✓ Traitements : toxine Cas1 purifiée à 5 ng/μL (Tox5), filtrats de deux souches (CCP et CCI6) et deux traitements à blancs (milieu de culture Cz et eau Tox0).
- ✓ Au moins trois répétitions biologiques par combinaison « stade x traitement ».

Les valeurs du tableau indiquent la moyenne %FE sur au moins trois répétitions biologiques

Les lettres en exposant indiquent la significativité des différences entre traitements ou entre stades foliaires, respectivement (test SNK, risque $\alpha = 0.05$).

Clone	Stade foliaire (âge foliaire depuis le débourrement)	Traitement					Moyenne/ stade foliaire
		Milieu culture Cz	Eau Tox0	Filtrat CCI6	Filtrat CCP	Tox5 Cas1 (5ng/μL)	
IRCA631	B2 (18-22 jours)	40.7	37.8	87.5	78.2	88.8	78.5 ^a
	C (23-30 jours)	11.2	11.6	57.9	48.5	87.2	52.5 ^b
	D (31-40 jours)	19.7	13.7	57.0	55.2	88.1	55.0 ^b
	D+ (> 40 jours)	15.6	16.4	34.6	25.4	24.6	25.1 ^c
	Moyenne/traitement	16.1 ^c	19.9 ^c	57.1 ^b	49.1 ^b	75.8 ^a	

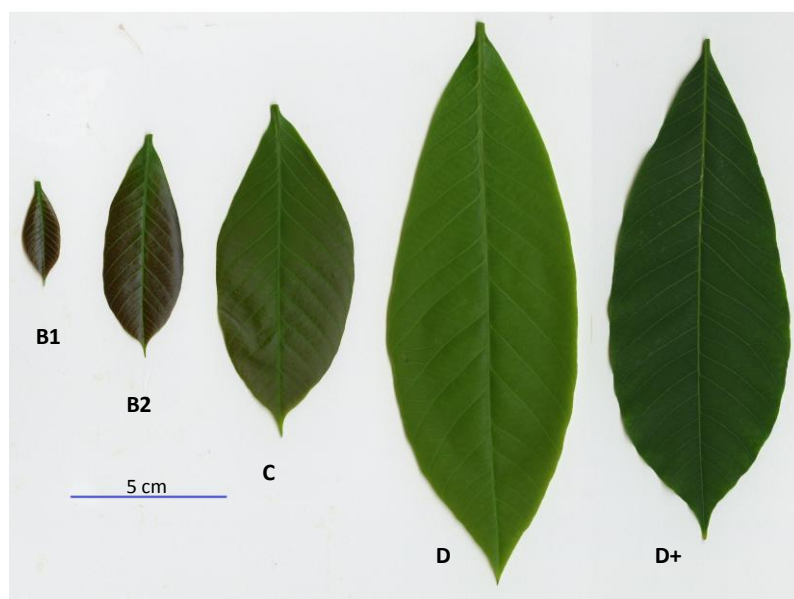


Tableau 3-2. Analyse de variance du critère %FE en fonction du stade foliaire (clone IRCA631) et du traitement toxinique (deux filtrats CCP et CCI6 ; Cas1 à 5 ng/μL ; et deux blancs Cz, Tox0)

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Stade foliaire	3	13072	4357	36.9	2.5e-16***	13
Traitement	4	62983	15746	133.3	2.2e-16***	64
Stade foliaire x Traitement	12	10277	856	7.3	1.7e-9***	10
Résidus	104	12283	118			13

dl : Degrés de liberté ; SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens ; Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité '***' $p < 0.001$ '**' $p < 0.01$ '*' $p < 0.05$

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport SCE sur SCE totaux

Quatre stades foliaires ont été testés :

- Stade B1 : 10-17 jours après le débourrement du bourgeon, les feuilles sont anthocyaniques et brillantes, dressées verticalement. A ce stade les feuilles sont trop petites pour le test toxinique, on ne peut pas découper deux rondelles de diamètre = 1.7 cm ou 2.2 cm² par foliole.
- Stade B2 : 18-22 jours après le débourrement, les feuilles restent encore anthocyaniques mais sont un peu plus large que celles du stade B1, ce qui rend le test en principe possible.
- Stade C : 23-30 jours après le débourrement, les feuilles sont toujours pendantes et flasques mais prennent une couleur vert clair.
- Stade D : 31-40 jours après le débourrement, les feuilles sont redressées mais ont encore une couleur vert clair
- Stade D+ : plus de 40 jours après le débourrement, alors qu'une nouvelle unité de croissance émerge, les feuilles de l'unité formée sont devenues rigides et de couleur vert foncé. Ces feuilles ont alors atteint leur pleine maturité.

Cinq traitements toxiques ont été appliqués: 1) la cassiicoline Cas1 purifiée, à la concentration en solution de 5 ng/μL (Tox5), 2) le filtrat d'origine CCP de la toxine Cas1 (souche des Philippines), 3) le filtrat CCI6 (souche de Côte d'Ivoire) et deux traitements à blanc : 4) eau = Tox0 et 5) milieu de culture Cz. Le test toxinique a été réalisé comme décrit dans le paragraphe §2.3 du chapitre 2 Matériel et Méthodes, avec trois à huit répétitions biologiques par combinaison « stade foliaire x traitement toxinique ».

Le Tab 3-1 montre une forte réponse du clone très sensible IRCA631 aux traitements toxiques très agressifs CCI6 et CCP pour les stades foliaires C et D. Pour le stade B2, on observe une réponse non seulement pour les traitements toxiques effectifs mais également pour les traitements à blanc. Pour le stade D+, la réponse paraît très faible. L'analyse de variance met en évidence des effets significatifs pour les stades foliaires, les traitements toxiques et les combinaisons stade x traitement (interaction).

Les folioles au stade B2, très fragiles, sont très sensibles à tous les traitements testés, même aux traitements à blanc (40.7 et 37.8 % respectivement pour Cz et Tox0). Pour les stades C, D et D+, les valeurs de %FE des traitements à blanc sont très faibles, variant de 11.2 à 19.7 %. En revanche, les folioles au stade D+ sont très résistantes à tous les traitements testés (de 15.6

à 34.6 %), y compris aux traitements agressifs. On en conclut que les stades foliaires B2 et D+ ne conviennent pas pour le test toxinique puisqu'ils rendent mal compte de la variabilité de réponse des folioles d'un clone sensible à la variabilité de l'agressivité des traitements. Au stade B2, les folioles sont très fragiles ce qui augmente le risque de transpercer la feuille lors du grattage de l'épiderme inférieur. Au stade D+, les folioles matures apparaissent résistantes aux traitements agressifs. Seuls les stades C et D paraissent donc bien adaptés pour le test toxinique. Par souci d'homogénéité, on choisit d'utiliser exclusivement des folioles au stade foliaire C, soit 23-30 jours après le débourrement.

L'analyse statistique des données de %FE (Tab 3-2) met en évidence des effets hautement significatifs pour les effets principaux que sont le stade foliaire, le traitement toxinique et l'interaction Stade foliaire x traitement. L'effet « traitement » représente la part la plus importante de la variation totale du %FE (64 %), l'effet « stade foliaire » (13 %) et l'effet d'interaction (10 %). La variation non contrôlée (part de la résiduelle) représente 13 % de la variation totale.

Tableau 3-3. Influence de la durée d'incubation (DI) sur les résultats du test toxinique.

Plan d'expérience :

- ✓ Clones utilisés : GT1 (résistant) et PB217 (sensible) ;
- ✓ Folioles au stade C.
- ✓ Traitements : toxine Cas1 purifiée à 0, 1, 5, 10 ng/μL (ou Tox0, Tox1, Tox5, Tox10).
- ✓ Au moins trois répétitions biologiques par combinaison « clone x traitement x durée d'incubation »

Les valeurs de %FE indiquées sont les moyennes sur au moins trois répétitions biologiques.

Clone	Traitement	Durée d'incubation			Moyenne/ "clone x traitement"
		24h	48h	72h	
GT1	Tox0	8.2	15.2	18.5	14.0
	Tox1	11.6	15.7	9.6	12.3
	Tox5	9.8	26.8	9.2	15.3
	Tox10	16.3	28.7	14.8	19.9
PB217	Tox0	16.9	20.8	17.0	18.3
	Tox1	15.4	29.6	21.8	22.3
	Tox5	38.5	58.3	50.8	49.2
	Tox10	60.6	80.3	57.1	66.0
Moyenne/ durée d'incubation		22.2	34.4	24.9	

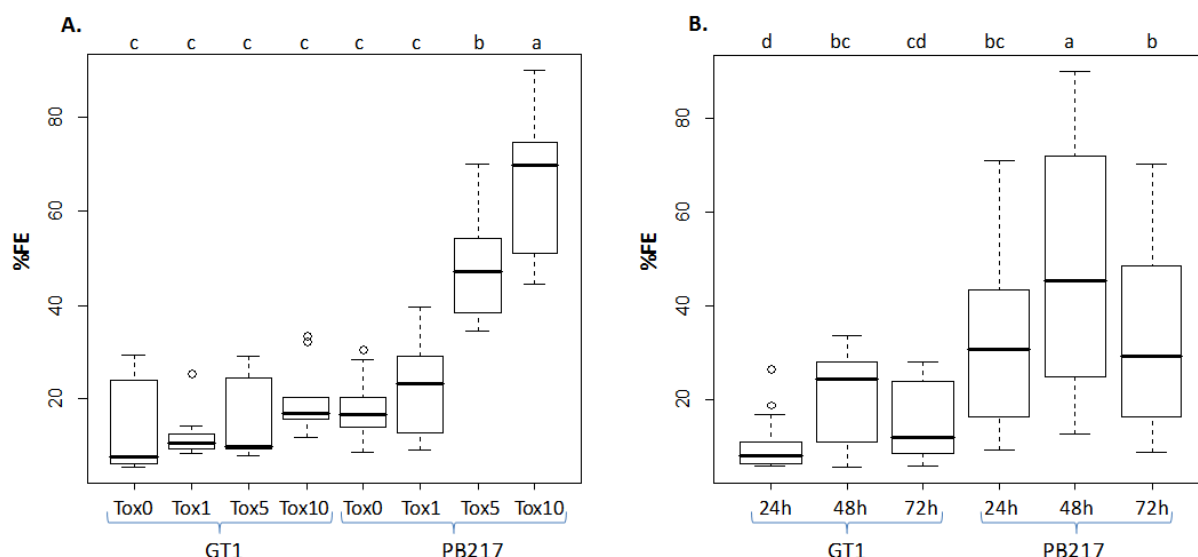


Fig 3.2: Effet de la concentration en toxine (A) et de la durée d'incubation (B) sur les résultats du test toxinique.

Distribution des données de %FE mesurées à partir de tissus foliaires traités par la toxine Cas1 purifiée à 0, 1, 5, 10 ng/ μ L (respectivement Tox0, Tox1, Tox5, Tox10) et trois temps d'incubation (24, 48 et 72 h), pour les clones GT1 (tolérant) et PB217 (sensible). Les lettres en haut indiquent la significativité des différences entre moyennes de %FE pour chaque combinaison (A) « clone x concentration » ou (B) « clone x durée d'incubation » (test SNK, risque $\alpha = 0.05$).

3.1.2 Durée d'incubation

Pour étudier l'influence de la durée d'incubation des solutions toxiques sur la feuille, nous avons utilisé la toxine Cas1 purifiée aux concentrations suivantes : Tox1 (1 ng/ μ L), Tox5 (5 ng/ μ L) et Tox10 (10 ng/ μ L), ainsi que le traitement à blanc Tox0 (eau). Ces traitements ont été appliqués sur deux clones, GT1 et PB217, connus pour être respectivement résistant et sensible à cette toxine (Breton et al., 2000). Trois durées d'incubation ont été testées : 24h, 48h et 72h, avec trois répétitions biologiques (trois plantes différentes) par traitement (Tab 3-3).

La Fig 3.2 présente la distribution des données de %FE pour les différentes combinaisons de facteurs « clone x concentration » (A), et « clone x durée d'incubation » (B). Le graphe A indique que les données de %FE sont en accord avec la sensibilité connue des clones, avec d'une part pour GT1, des valeurs médianes variant peu et faibles même à la concentration en toxine la plus élevée (Tox10), et d'autre part pour PB217 des valeurs médianes croissant fortement avec la concentration en toxine. Le graphe B indique que la durée d'incubation de 48 heures génère la plus forte réponse au test toxinique pour chacun des deux clones. Une durée d'incubation de 24h paraît donc insuffisante, en particulier pour les clones peu sensibles tels que GT1. Le fait que les %FE mesurés après 72 h d'incubation soient en moyenne plus

faibles que ceux mesurés après 48h suggère une perte en électrolytes des folioles lors de la phase d'incubation, avant le prélèvement des rondelles, ce qui induirait ensuite une sous-estimation du pourcentage réel de fuite d'électrolytes hors des folioles lors de la phase de macération. En effet, sous l'action prolongée des toxines (72h), la cuticule de l'épiderme supérieur n'est probablement plus imperméable ; des électrolytes pourraient donc « s'échapper » des tissus abîmés et être absorbés par le papier servant à maintenir l'humidité dans la boîte. La durée d'incubation de 48h paraît donc optimale et sera utilisée en routine pour la poursuite de nos expérimentations.

L'analyse statistique des données de %FE (Tab 3-4) met en évidence des effets hautement significatifs pour les effets principaux que sont la durée d'incubation, la concentration en toxine et l'effet clonal. En revanche, les effets d'interaction « durée d'incubation x traitement » et « durée d'incubation x clone » ne sont pas significatifs. L'effet « clone » représente la part la plus importante de la variation totale du %FE (37 %), devant l'effet « toxine » (28 %) et devant l'effet de la durée d'incubation (11 %). Les parts de variation expliquées par les deux effets d'interaction considérés « durée d'incubation x traitement » et « durée d'incubation x clone » sont seulement de 3 et 1 %. La variation non contrôlée (part de la résiduelle) représente 20 % de la variation totale.

Tableau 3-4. Analyse de variance du critère %FE en fonction du clone (GT1 ou PB217), du traitement en toxine Cas1 (0, 1, 5 ou 10 ng/μL) et de la durée d'incubation (24, 48, 72 h).

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Clone	1	11348	11348	80,8	6.3e-14***	37
Traitement	3	8526	2842	20,2	5.9e-10***	28
Durée d'incubation (DI)	2	3406	1703	12,1	2.4e-5***	11
DI x Traitement	6	855	142,5	1,0	0.42	3
DI x Clone	2	362	181	1,3	0.28	1
Résidus	84	5997	71			20

DI : Durée d'incubation

dl : Degrés de liberté

SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens

Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité '***' p < 0.001 '**' p < 0.01 '*' p < 0.05

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport SCE sur SCE totaux

3.1.3 *Position de la rondelle prélevée*

Lors de la phase d'incubation, la toxine diffuse dans la feuille au-delà de la zone d'application de la solution et nécrose les tissus, ce qui libère des électrolytes. On peut supposer que la libération des électrolytes est plus importante au point de dépôt de la toxine que dans les zones périphériques de ce point de dépôt, d'une part parce que la toxine se dilue en diffusant et d'autre part parce que son temps d'action est plus long au point de dépôt qu'en périphérie (compte-tenu du temps de diffusion). Cependant, si la nécrose est très importante au point de dépôt, il se peut que la cuticule soit dégradée et laisse échapper des électrolytes durant la phase d'incubation, avant le prélèvement des rondelles (les électrolytes libérés ne sont alors plus mesurables dans la solution de macération). On peut supposer qu'un prélèvement dans une zone plus éloignée du point de dépôt, par exemple au niveau du front de migration de la toxine où les dégradations tissulaires sont a priori moins fortes qu'au point de dépôt initial puisse donner un %FE plus représentatif de l'effet qu'on cherche à mesurer à savoir la sensibilité des tissus au traitement toxinique.

Un essai a été réalisé sur le clone sensible PB217 pour tester cette hypothèse (Tab 3-5), avec quatre concentrations de toxine : 0, 1, 5 et 10 ng/μL (Tox0, Tox1, Tox5 et Tox10 respectivement). Les prélèvements des rondelles ont été effectués au point de dépôt de la toxine (niveau n0) et à des positions de plus en plus éloignées, à 2, 4, 6 cm du point de dépôt (n1, n2, n3 respectivement).

Le résultat (Fig 3.3) a montré que les valeurs mesurées aux positions n1, n2 et n3 étaient faibles et non significativement différentes des valeurs du traitement à blanc (Tox0) quelle que soit la concentration en toxine appliquée. Seuls les prélèvements effectués au point de dépôt de la toxine (niveau n0) ont révélé des %FE importants et croissants avec la concentration en toxine. D'une part, au point de dépôt, la cuticule de la face supérieure (en contact avec le papier) était encore intacte au moment du prélèvement et donc capable de retenir les électrolytes libérés sous l'action des toxines. D'autre part, la toxine cassiicoline ne diffusait pas de manière très étendue à travers les tissus de la feuille puisque les %FE mesurés aux positions n1, n2 et n3 n'étaient pas significativement différents entre eux ni différents du traitement à blanc, même pour la plus forte concentration en toxine. Les échantillons prélevés au point de dépôt n0 apparaissent donc comme les plus appropriés pour mesurer les réponses des clones aux traitements toxiques. On a donc choisi de réaliser le test toxinique avec des prélèvements au point n0.

Tableau 3-5. Influence de la position de la rondelle prélevée

Plan d'expérience :

- ✓ Folioles au stade C du clone utilisé : PB217.
- ✓ Traitements : toxine Cas1 purifiée, à 0, 1, 5 et 10 ng/μL (respectivement Tox0, Tox1, Tox5 et Tox10). Temps d'incubation : 48 h.
- ✓ La position des rondelles prélevées est illustrée par la photo : n0, point d'application de la goutte (x); n1, n2 et n3, positions adjacentes, à environ 2, 4 et 6 cm respectivement du point de dépôt (la dimension d'une rondelle est 1.7 cm de diamètre ou 2.2 cm²).
- ✓ Trois répétitions biologiques par combinaison « traitement x position »

Les valeurs du tableau indiquent la moyenne %FE sur trois répétitions biologiques

Clone	Traitement	Position des rondelles			
		n0	n1	n2	n3
PB217	Tox0	12.8	9.1	9.5	8.9
	Tox1	29.6	9.9	11.6	10.1
	Tox5	55.5	7.4	9.4	8.2
	Tox10	80.3	12.0	13.1	14.8

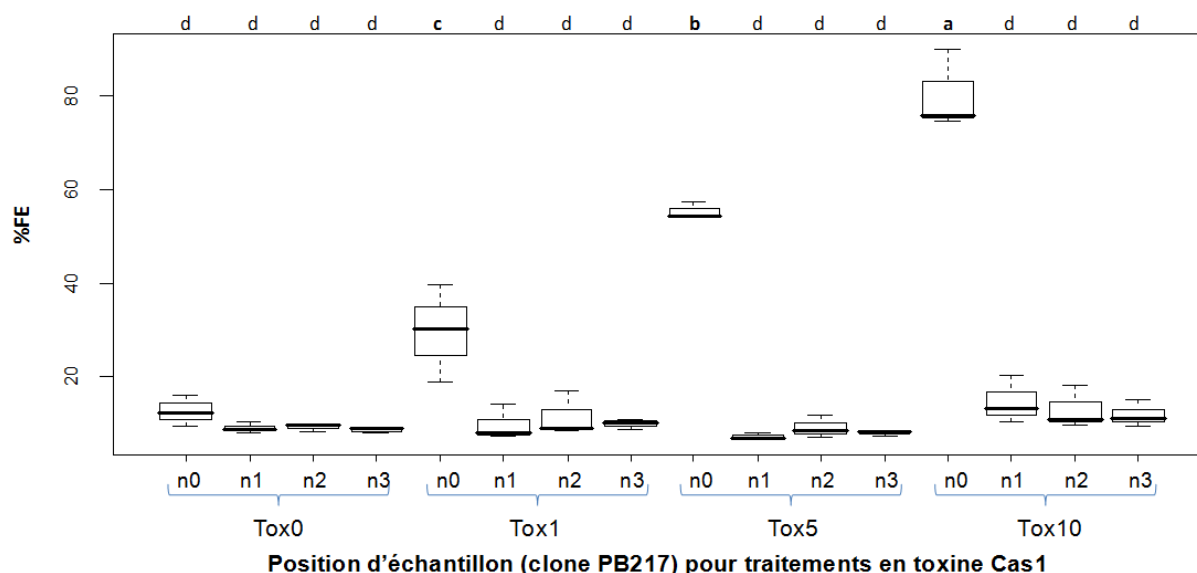
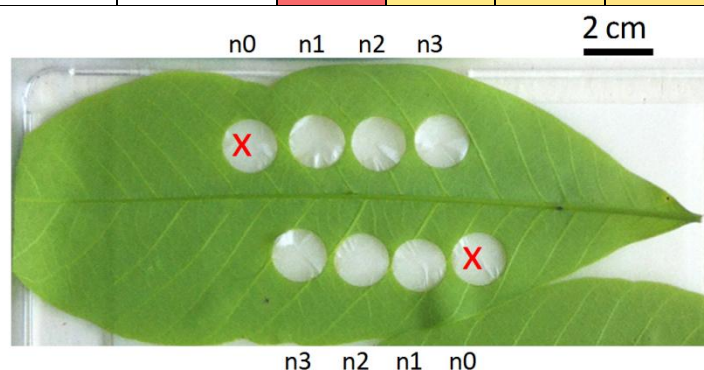


Fig 3.3: Distribution des données de %FE pour les différentes combinaisons de l'expérience testant l'effet de la position de l'échantillon (clone PB217).

- ✓ Distances du prélèvement (n1, n2, n3) par rapport au point de dépôt de la toxine (n0)

- ✓ Traitements en toxine à 0, 1, 5 et 10 ng/μL (ou Tox0, Tox1, Tox5 et Tox10).

Les lettres en haut indiquent la significativité des différences entre moyennes de %FE pour chaque combinaison « traitement x position » (test SNK, risque α = 0.05).

L'analyse statistique des données de %FE (Tab 3-6) met en évidence des effets hautement significatifs pour les effets principaux que sont la position de l'échantillon et le traitement à base de toxine Cas1. L'effet « position de l'échantillon » représente la part la plus importante de la variation totale du %FE (54 % de la SCE totale), devant l'effet du traitement (15 %). La variation non contrôlée (part de la résiduelle) représente 32 % de la variation totale mesurée par la SCE.

Tableau 3-6. Analyse de variance du critère %FE en fonction de la position des échantillons de clones (GT1 ou PB217), du traitement en toxine Cas1 (0, 1, 5 ou 10 ng/μL).

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Position d'échantillon	3	10399	3466	24,8	1.5e-9***	54
Traitement	3	2862	954	6,8	7.1e-4***	15
Résidus	44	6152	140			32

dl : Degrés de liberté ; SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens ; Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité '***' p < 0.001 '**' p < 0.01 '*' p < 0.05

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport SCE sur SCE totaux

3.1.4 Agitation des tubes en phase de macération

Selon la procédure initialement définie, la macération des rondelles de feuilles dans l'eau était réalisée avec une agitation permanente, en plaçant les portoirs de tubes sur un agitateur. Cela représentait une contrainte pratique importante sur plantations compte-tenu du grand nombre d'expérimentations pratiquées, car il n'était pas possible d'agiter plus d'un portoir à la fois. Un essai a donc été réalisé avec le clone PB217 et quatre concentrations en toxine Cas1, afin de tester l'effet de l'agitation (présence ou absence) sur la mesure de %FE (Tab 3-7) et juger *in fine* de son utilité. L'analyse de variance a montré la non-significativité de l'effet « agitation ». En revanche, on a confirmé l'importance de l'effet « toxine », qui explique 71 % de la variation totale de %FE. La macération peut donc être réalisée sans agitation (Tab 3-8).

3.1.5 Comparaison du test toxinique et du test par inoculation conidienne

Pour juger si la sensibilité des clones d'hévéa aux traitements toxiques de *Corynespora* est représentative de leur sensibilité au champignon lui-même, nous avons comparé la réponse de huit clones d'une part à deux filtrats de culture grâce au test toxinique, et d'autre part aux suspensions de conidies des champignons des deux souches correspondant aux deux filtrats. Cette expérience a été effectuée sur des feuilles détachées de plantes en pots cultivées en serre à Montpellier pour les huit clones GT1, PB260, PB217, IRCA18, IRCA41, IRCA631,

RRIC100 et RRIM600, avec les deux souches très agressives, CCP (type C/Cas1, Philippines) et CCI13 (type A4/Cas0, Côte d'Ivoire). L'effet des filtrats a été estimé par la mesure du pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE), dans les conditions optimales du test toxinique telles que définies précédemment. L'effet du champignon inoculé est mesuré par la surface de nécrose induite par l'inoculation conidienne (SN, en mm²).

Tableau 3-7. Influence de l'agitation lors de la phase de macération

Plan d'expérience :

- ✓ Clone utilisé : PB217.
- ✓ Traitements : toxine Cas1 purifiée, à 1, 5 et 10 ng/μL (ou Tox1, Tox5 et Tox10).
- ✓ Incubation pendant 48h.
- ✓ Macération avec ou sans agitation.
- ✓ Trois répétitions biologiques par combinaison « traitement x agitation »

Les valeurs du tableau indiquent la moyenne %FE sur trois répétitions biologiques

Clone	Traitement	Agitation	
		Présence	Absence
PB217	Tox1	28.7	43.3
	Tox5	47.9	52.4
	Tox10	70.2	72.2

Tableau 3-8. Analyse de variance du critère %FE mesuré sur le clone PB217 en fonction du facteur « agitation » (présence ou absence) et de traitements en toxine (1, 5 ou 10 ng/μL).

Source de variation	DI	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Agitation	1	224.8	224.8	2.3	0.16	4
Traitement	2	3765.9	1883.0	18.8	2e-4***	71
Agitation x Traitement	2	135.0	67.5	0.7	0.53	3
Résidus	12	1200.1	100.0			22

dl : Degrés de liberté ; SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens ; Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité '***' p < 0.001 '**' p < 0.01 '*' p < 0.05

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport SCE sur SCE totaux

Les résultats présentés dans le Tab 3-9 et illustrés par la Fig 3.4 permettent de caractériser la corrélation entre les deux méthodes pour chaque souche. Ces résultats montrent tout d'abord que la souche CCP est plus agressive que la souche CCI13 pour les deux méthodes (test toxinique et test d'inoculation), du fait d'une plus grande variation de réponse entre les clones. Ainsi la moyenne par souche pour la variable %FE est de 39.6 % pour la souche CCP contre 26.7 % pour la souche CCI13. La moyenne par souche pour la variable SN est de 14.2 % pour la souche CCP contre 8.5 % pour la souche CCI13. Chacune des deux méthodes permet de différencier les clones, et met en évidence la très forte sensibilité du clone IRCA631, et la très bonne résistance de IRCA41 et GT1.

Tableau 3-9. Comparaison de deux méthodes de mesure des réponses de huit clones à deux isolats : test toxinique et par inoculation conidienne

Plan d'expérience :

- ✓ Clones utilisés : GT1, PB217, PB260, RRIC100, RRIC600, IRCA18, IRCA41 et IRCA631, cultivés en serre au CIRAD (Montpellier).
- ✓ Souches utilisées : CCP (type C/Cas1, Philippines) et CCI13 (type A4/Cas0, Côte d'Ivoire), sous forme de filtrat de culture ou de suspension conidienne.
- ✓ Témoins : deux traitements à blanc H₂O et Tween20 0.02 %.
- ✓ Trois répétitions biologiques par combinaison « clone x traitement »

La sensibilité aux filtrats est exprimée par le pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE). La sensibilité au champignon est exprimée par la surface de nécrose (SN, en mm²) induite suite à l'inoculation de spores. Les valeurs du tableau indiquent les moyenne %FE et SN. Les lettres en exposant indiquent la significativité des différences entre clones pour chaque traitement (test SNK au risque $\alpha = 0.05$).

Traitement	Isolat CCP		Isolat CCI13		Témoin	
	Application du filtrat	Inoculation conidienne	Application du filtrat	Inoculation conidienne	H ₂ O	Tween20 0.02 %
Clone	%FE	SN	%FE	SN	%FE	SN
IRCA631	76.4 ^a	27.5 ^a	40.7 ^a	17.9 ^a	15.8	0
PB260	59.7 ^b	21.7 ^b	37.4 ^b	10.6 ^{bc}	16.4	0
IRCA18	54.4 ^b	21.6 ^b	28.4 ^b	8.4 ^c	18.2	0
PB217	42.0 ^c	19.6 ^b	10.8 ^c	6.9 ^c	11.0	0
RRIC100	37.5 ^{cd}	11.7 ^c	33.9 ^b	13.6 ^b	19.5	0
RRIM600	20.4 ^{de}	8.8 ^c	32.8 ^b	8.9 ^c	13.7	0
GT1	15.3 ^e	1.0 ^d	14.4 ^c	1.4 ^d	12.5	0
IRCA41	11.3 ^e	1.3 ^d	15.3 ^c	0.0 ^d	19.1	0
Moyenne	39.6	14.2	26.7	8.5	15.8	0

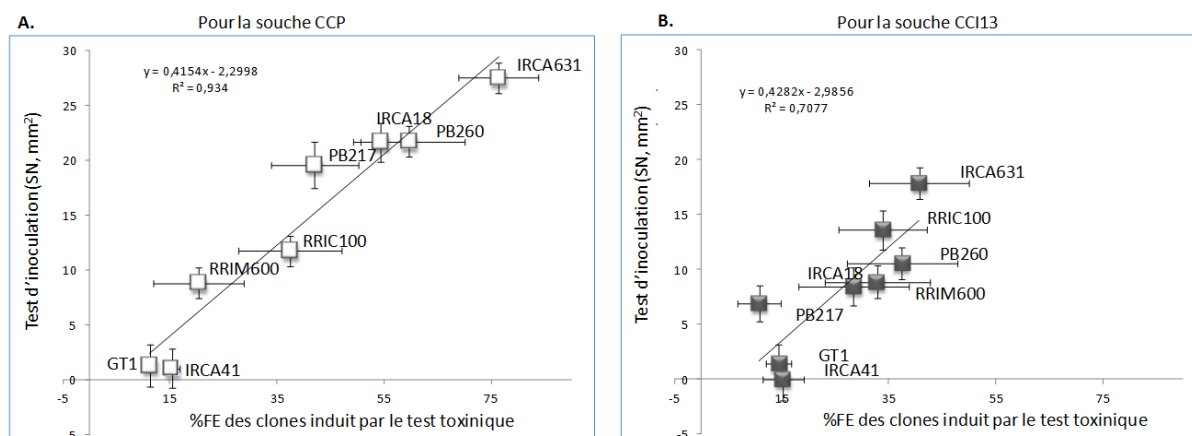


Fig 3.4: Sensibilités comparées de huit clones d'hévéa estimées par le test toxinique ou par inoculation conidienne

(Plan d'expérience décrit dans le Tab 3-9)

En abscisse : sensibilité aux filtrats exprimée par %FE pour chaque clone. En ordonnée : sensibilité au champignon exprimée par la surface nécrosée SN (mm²) induite après les inoculations conidiennes. Panneau A : souche CCP. Panneau B : souche CCI13. Barres d'erreur : erreurs-types des moyennes issues de trois répétitions biologiques.

Tableau 3-10. Analyse de variance du critère %FE et (SN, en mm²) mesurés respectivement par le test toxinique et le test d'inoculation.

Facteurs clone, traitement et interaction clone x traitement.

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Test toxinique						
Clone	7	12167	1738	13.4	2.6e-10***	34
Traitement	2	7368	3684	28.3	2.0e-9***	21
Clone x Traitement	14	8206	586	4.5	1.8e-5***	23
Résidus	61	7934	130			22
Test d'inoculation						
Clone	7	26269	3753	39.3	< 2.2e-16***	20
Traitement	2	21419	10710	112.2	< 2.2e-16***	16
Clone x Traitement	14	10788	771	8.1	< 2.8e-16***	8
Résidus	784	74823	95.4375			56

dl : Degrés de liberté

SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens

Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité '***' p < 0.001 '**' p < 0.01 '*' p < 0.05

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport SCE sur SCE totaux

L'analyse statistique des données de %FE et de SN (Tab 3-10) met en évidence des effets hautement significatifs pour les effets principaux (clone et traitement) et interactif « clone x traitement ». Pour le test toxinique, ces effets expliquent au total 77 % de la variance du modèle statistique, avec des contributions respectives de 34, 20 et 23 %, en comparaison avec le test par l'inoculation sur cette gamme de clones, des contributions sont 20, 16 et 8 % respectivement. La variation résiduelle est très importante pour le test par l'inoculation (56 %) par rapport le test toxinique (23 %).

Tableau 3-11. Comparaison des réponses de huit clones d'hévéa à deux souches de *Corynespora*, estimées par le test toxinique ou par inoculation conidienne (spores CCI13 et CCP).

Coefficients de corrélation entre les traitements. dl=6, signification * : $\alpha=0.05$, $r_s=0.71$; signification ** : $\alpha=0.01$, $r_s=0.83$. Plan d'expérience décrit dans le Tab 3-9

Variables	Isolates	Application du filtrat		Inoculation en conidies	
		CCI13	CCP	CCI13	CCP
Application du filtrat	CCI13	1			
	CCP	0.64	1		
Inoculation en conidies	CCI13	0.84**	0.81*	1	
	CCP	0.56	0.97**	0.78*	1

Sur un regroupement des données mesurées avec les deux souches CCP et CCI13 (2 méthodes x 8 clones x 2 souches = 16 couples de données), la corrélation positive entre les deux méthodes ($r = 0.94$) était hautement significative (seuil de signification $r_s = 0.62$ pour $\alpha = 0.01$). Si l'on considère chaque isolat séparément, les coefficients de corrélation entre les deux séries de moyennes %EF et SN valaient $r = 0.97$ et $r = 0.84$, pour CCP et CCI13 respectivement (Tab 3-11).

3.1.6 Bilan des résultats de la section 3.1

Les différentes expériences méthodologiques effectuées permettent de formuler les conclusions suivantes :

- Le stade foliaire C, soit 23-30 jours après le débourrement, est bien adapté pour le test toxinique, justifiant son choix comme condition de référence.
- La durée d'incubation de 48h paraît optimale et sera utilisée en routine pour la poursuite de nos expérimentations.
- Les échantillons prélevés au point de dépôt n0 permettent d'obtenir des valeurs de %FE rendant bien compte d'une réponse croissante avec la sensibilité des clones et l'agressivité des traitements toxiques
- L'agitation au cours de la phase de macération n'augmente pas la réponse des folioles aux traitements agressifs. Causant par ailleurs une perte de temps, elle apparaît donc inutile.

Ces expériences ont permis de confirmer que, dans les conditions définies ci-dessus, le test toxinique fournit bien des réponses croissantes avec la concentration de la solution de toxine Cas1 appliquée représentant une agressivité croissante du traitement toxinique. Le test génère des réponses différentielles entre les clones et entre les filtrats de culture, permettant ainsi d'estimer la sensibilité de ces clones et l'agressivité de ces filtrats. Enfin, pour les combinaisons entre huit clones d'hévéa et deux souches de *Corynespora*, une corrélation positive hautement significative a été trouvée entre les résultats du test toxinique et ceux du test d'inoculation de conidies sur feuilles détachées. Le test toxinique semble donc prédictif de la sensibilité au champignon lui-même. Nous avons donc poursuivi l'étude du test sur de plus larges gammes de clones et de filtrats issus de souches de différents types, à la fois pour explorer et caractériser la variabilité de réponse et pour acquérir une meilleure connaissance de la relation *H. brasiliensis* x *Corynespora* dans les conditions de ce test.

Tableau 3-12. Description des expériences de test toxinique.

Expérience CF (bleu+vert): réalisée à Clermont-Ferrand sur feuilles détachées de plantes en serre (31 clones x 17 traitements). Expérience CI (jaune+vert): réalisée en Côte d'Ivoire sur feuilles détachées de plantes en champ (20 clones x 25 traitements). En vert, combinaisons clone x traitement communes aux expériences : 19 clones x 11 traitements. Deux méthodes d'évaluation des symptômes ont été appliquées : la mesure du pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE) et la mesure de la surface de nécrose (SN).

Expérience CF							Expérience CI										Commun entre Expériences CF et CI																		
	Type	B4/Cas5	A/Cas2+6	A3/Cas0	?/Cas3	A/Cas2	G/Cas0	Cas1 (1ng/μL)	Cas1 (5ng/μL)	Cas1 (10ng/μL)	Milieu culture	C/Cas1	B4/Cas5	F1/Cas0	A4/Cas0	A4/Cas0	A4/Cas0	Eau	B4/Cas5	C/Cas1	A4/Cas0	A4/Cas0	B4/Cas5	A4/Cas1	B4/Cas5	CF/Cas4	A4/Cas2	A4/Cas0	A4/Cas0	C/Cas0	C/Cas1	C/Cas1			
Clone	Trait.	CSB1	RUD	CGAB3	E70	IA	E55	Tox1	Tox5	Tox10	CZ	CCP	CSB16	CTHA3	CIND3	CSRI5	CLN16	Tox0	TSB1	CCAM3	CCI13	CCI6	CCI416	CCI405	CCI449	CCI423	CCI402	CCI403	CCI434	CCP*	CNIG404	CCI501			
FDR5802								FE-SN	FE-SN	FE-SN								FE																	
IRCA331								FE	FE	FE								FE																	
CDC312	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN						FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN		FE																	
PMB1	FE	FE	FE	FE	FE	FE					FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE																	
IRCA631	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN																		
MDF180	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN																		
RRIM802	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN																		
Yunyan77-4	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN																		
CDC56	SN	SN	SN	SN	SN	SN	FE	FE	FE	FE-SN	FE-SN	SN	SN	SN	SN	SN	SN	FE																	
IRCA230	SN	SN	SN	SN	SN	SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	SN	SN	SN	SN	SN	FE																	
IRCA145	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN													
IRCA18	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN													
CD1174	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
FDR4575	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
FDR5240	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
FDR5665	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
FDR5788	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
GT1	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
IRCA19	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
IRCA41	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
MDX607	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
MDX624	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
PB217	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
PB254	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
RRIC100	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
RRIM600	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
RRIM901	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
RRIM926	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
PB260							FE	FE	FE									FE	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			
IRCA303																		FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE-SN	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE	FE			

3.2 Application du test toxinique pour le phénotypage d'une gamme de clones

Le test toxinique a été appliqué au phénotypage d'une gamme diversifiée de clones avec les exsudats de différentes souches de *Corynespora*. La première expérience (CF) a été réalisée en France à Clermont-Ferrand par Marine Déon (données non publiées), à partir de folioles prélevées sur des plantes cultivées en pots sous serre. La seconde expérience (CI) a été réalisée sur deux plantations de Côte d'Ivoire, à partir de folioles prélevées sur des souches de jardins à bois de greffe, et parfois des arbres de plantation. Deux méthodes d'évaluation des symptômes ont été appliquées : la mesure par conductivité du pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE) et la mesure visuelle de la surface de nécrose induite (SN). Nous avons analysé conjointement les jeux de données obtenus en France et en Côte d'Ivoire afin d'évaluer la validité du test et son potentiel pour les programmes de sélection. Le Tab 3-12 présente les combinaisons de facteurs clone x traitement et les critères mesurés dans les deux expériences.

- Concernant l'expérience CF, on a obtenu 1221 mesures élémentaires %FE et 1212 mesures SN, avec 2 à 3 répétitions biologiques par combinaison, pour un total de 31 clones x 17 traitements. On dispose des données conjointes des deux critères %FE et SN pour 331 combinaisons (26 clones x 16 traitements).
- Concernant l'expérience CI, on a obtenu 1774 mesures %FE et 1150 mesures SN, avec 3 répétitions par combinaison, pour un total de 20 clones x 25 traitements. On dispose des données conjointes des deux critères pour 300 combinaisons (20 clones x 15 traitements).
- Pour les combinaisons communes aux deux expériences, on dispose de résultats conjoints des deux critères pour une matrice de 19 clones x 11 traitements (209 combinaisons), permettant d'apprécier la répétabilité du test sur les deux expériences.
- Enfin, une analyse globale portant sur l'ensemble des combinaisons clone x traitement de l'une ou l'autre des deux expériences a été réalisée.

Nous présenterons tout d'abord une comparaison des critères %FE et SN pour chacune des deux expériences, afin d'apprécier la pertinence de chacun de ces critères pour la mesure des réponses des clones aux traitements toxiques. Ensuite, nous évaluerons la répétabilité des résultats obtenus dans les deux expériences. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus

Tableau 3-13. Expérience CF. Réponses en %FE et SN de 26 clones à 17 traitements.

Les valeurs présentées sont les moyennes d'au moins deux répétitions biologiques. Les couleurs représentent le gradient des valeurs %FE et SN, des plus fortes (rouge) aux plus faibles (vert). Classement des clones et des traitements selon les moyennes par clone et par traitement respectivement pour %FE.

Réponse %FE :

Type	Response to treatment																	Moy./ clone	
Clone	Trait.	Cz	Tox0	RUD	CGAB3	CSB16	CSB1	E70	IA	CLN16	E55	Tox1	CSRI5	CTND3	CTHA3	Tox5	CCP		Tox10
				A/Cas2+6	A3/Cas0	B4/Cas5	B4/Cas5	?/Cas3	A/Cas2	A4/Cas0	G/Cas0	Cas1 (1ng/μL)	A4/Cas0	A4/Cas0	F1/Cas0	Cas1 (5ng/μL)	C/Cas1	Cas1 (10ng/μL)	
FDR5665		9	9	11	7	9	12	9	8	9	10	7	8	9	14	7	7	11	9
FDR5240		10	10	8	10	9	11	11	12	9	19	10	9	10	25	10	10	13	12
RRIM600		10	10	10	13	12	19	13	15	12	12	14	13	11	22	13	11	12	13
MDX624		9	8	11	11	13	11	13	14	13	11	11	18	23	13	12	16	19	13
MDX607		8	9	22	10	16	17	10	16	24	15	9	10	12	23	11	9	19	14
RRIC100		9	10	10	10	9	17	14	9	12	9	12	11	13	17	19	34	26	14
CD1174		9	9	16	12	16	12	11	11	20	12	9	37	23	15	13	10	17	15
IRCA230		11	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14	NA	NA	NA	20	13	18	15
IRCA41		9	11	10	11	11	13	10	9	11	14	15	11	11	20	25	17	53	15
FDR5802		NA	9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9	NA	NA	NA	19	NA	29	17
IRCA145		10	8	9	13	11	15	19	20	13	15	13	23	11	20	34	23	41	17
GT1		13	11	16	16	13	38	32	13	13	21	9	13	33	50	11	12	10	19
PMB1		11	9	11	11	14	11	15	29	11	27	NA	11	21	32	NA	66	NA	20
PB217		9	12	10	11	11	13	14	18	11	23	15	15	11	18	54	51	56	21
IRCA19		10	11	11	9	11	17	13	16	12	17	33	12	11	36	44	57	61	22
CDC312		NA	10	10	12	16	9	11	32	NA	31	NA	36	28	42	NA	33	NA	22
PB254		9	10	12	11	12	15	11	13	12	14	46	10	11	31	58	42	68	23
IRCA18		9	11	11	11	12	24	12	10	18	12	38	22	30	16	49	55	44	23
FDR5788		9	13	9	13	38	13	26	27	37	33	15	47	49	42	17	17	15	25
RRIM926		10	8	9	12	28	13	12	9	40	14	19	47	53	13	37	59	40	25
IRCA631		9	9	10	9	14	13	11	13	25	9	43	39	38	20	59	73	68	27
MDF180		19	11	24	22	25	34	35	32	23	30	19	12	22	38	28	57	35	27
RRIM901		14	8	19	19	25	12	27	32	30	42	26	48	33	38	43	66	62	32
FDR4575		17	11	10	23	25	15	36	29	33	30	16	56	57	39	46	64	73	34
IRCA331		NA	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	25	NA	NA	NA	57	NA	67	40
CDC56		9	11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	43	NA	NA	NA	59	58	68	41
Moy./trait.		11	10	12	13	16	16	17	18	18	19	20	23	24	27	31	36	39	21

Réponse SN (mm²):

Response to A/Cas1																		
		A/Cas2+6	A3/Cas0	B4/Cas5	B4/Cas5	?/Cas3	A/Cas2	A4/Cas0	G/Cas0	Cas1 (1ng/μL)	A4/Cas0	A4/Cas0	F1/Cas0	Cas1 (5ng/μL)	C/Cas1	Cas1 (10ng/μL)		
Cz	Tox0	RUD	CGAB3	CSB16	CSB1	E70	IA	CLN16	E55	Tox1	CSRI5	CIND3	CTHA3	Tox5	CCP	Tox10	Moy./clone	
0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	NA	0.1	0.1	0.2	NA	0.0	NA	0.1	
0.1	0.1	0.5	0.2	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.8	0.1	0.3	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1	0.2	
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	NA	0.1	0.1	0.5	NA	0.1	NA	0.1	
0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.4	0.3	0.2	0.5	0.2	0.2	0.1	0.3	0.3	0.4	0.6	0.3	
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	NA	0.1	0.1	0.3	NA	0.6	NA	0.1	
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	0.7	0.1	0.1	0.3	2.0	3.3	4.1	0.7	
0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	1.0	0.1	0.3	0.2	1.2	0.3	0.3	
0.1	NA	6.1	11.2	0.1	0.3	7.6	0.1	10.8	0.3	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.5	0.2	2.4	
0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.3	0.5	0.3	0.0	3.4	0.9	0.2	0.1	0.8	0.5	0.4	NA	0.5	
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.0	NA	NA	NA	0.1	NA	0.1	0.1	
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	1.9	0.0	1.7	NA	0.0	0.0	0.5	NA	2.0	NA	0.5	
0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.1	0.3	0.2	0.5	0.1	0.2	0.1	0.2	
0.0	NA	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	NA	NA	1.7	0.1	0.1	NA	4.1	NA	0.6	
0.1	0.9	0.1	0.2	1.7	1.7	0.3	0.3	0.2	0.8	2.2	0.3	0.3	2.0	36.9	3.7	36.9	5.2	
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.5	0.9	0.1	0.1	0.4	NA	3.5	NA	0.4	
NA	NA	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	7.9	NA	1.1	NA	0.2	0.2	0.9	NA	0.5	NA	1.1	
0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.5	0.2	0.2	0.7	5.3	0.2	0.1	0.4	32.7	8.6	36.2	5.1	
0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.5	3.6	0.2	0.1	0.5	18.4	11.0	26.6	3.7	
0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	NA	0.2	0.2	0.1	NA	2.0	NA	0.3	
0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	1.7	0.7	1.1	12.1	14.8	0.4	4.0	6.1	6.9	2.9	
0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.1	0.1	0.2	3.2	0.3	0.1	0.3	8.5	6.4	13.2	2.0	
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.9	0.1	2.9	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	1.4	25.0	1.9	
0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	NA	0.3	0.2	0.4	NA	9.2	NA	0.8	
0.1	0.2	0.1	0.3	0.3	0.3	0.4	0.2	0.3	0.4	NA	1.4	0.7	0.4	NA	4.9	NA	0.7	
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.4	NA	NA	NA	4.9	NA	15.2	6.8	
0.1	NA	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	NA	0.1	0.1	0.1	NA	16.3	NA	1.3	
0.1	0.1	0.4	0.6	0.2	0.3	0.5	0.6	0.7	0.7	1.0	0.8	0.8	0.4	6.4	3.6	10.4	1.4	

pour d'une part la résistance/sensibilité des clones et d'autre part l'agressivité des traitements toxiques, ainsi que la structure des réponses observées pour les clones et les traitements étudiés (effets principaux et interactions, dissimilarités entre clones ou entre traitements).

3.2.1 Comparaison des critères %FE et SN (test toxinique)

3.2.1.1 Expérience menée à Clermont-Ferrand (CF)

Les combinaisons communes étudiées pour les deux critères (%FE et SN) dans l'expérience CF portaient sur 26 clones x 17 traitements (Tab 3-13). Les traitements comportaient trois concentrations de cassiicoline Cas1 purifiée (1, 5, 10 ng/μL, respectivement Tox1, Tox5 et Tox10), les filtrats de culture de 12 isolats de *Corynespora* d'origines géographiques et de types variés (le type étant défini par le groupe génétique et la classe toxinique), et les deux traitements à blanc Cz et Tox0. Les valeurs moyennes %FE et SN par combinaison sont présentées dans le Tab 3-13.

La comparaison des critères %FE et SN mesurés sur ce jeu de données a montré que la méthode conductimétrique (%FE) était plus sensible que la méthode visuelle (SN) pour différencier les clones et les traitements. Sur le Tab 3-13, le critère %FE montre une plus grande variabilité que le critère SN, permettant notamment une distinction plus importante entre les combinaisons présentant des réponses faibles ou fortes. La Fig 3.5 permet de comparer les distributions des données %FE et SN sur une série conjointe de 331 couples de données. Le nuage de points de cette figure ne paraissait pas adapté à une modélisation par une équation de régression linéaire, et on en fait donc une interprétation qualitative. Cette figure montre, pour %FE comme pour SN, une prédominance de valeurs faibles (abondance de combinaisons clone x traitement montrant une faible réponse). Cette prédominance est cependant beaucoup plus importante pour SN que pour %FE. En effet, seule la cassiicoline Cas1 aux concentrations élevées (Tox5 et Tox10) ainsi que le filtrat de la souche d'origine (CCP) ont généré des valeurs SN suffisamment variables pour permettre de différencier les 26 clones : 94 % des combinaisons clone x traitement montrent des données SN inférieures à 5 mm² et des données %FE distribuées sur la quasi-totalité de la plage de variation. Pour les 21 cas où SN est supérieur à 5 mm², on trouve 18 cas où le traitement toxinique concerne le filtrat CCP ou la toxine purifiée Cas1. En revanche, ces 18 cas concernent 10 clones différents. Le critère %FE permet donc une caractérisation quantitative plus différenciée des réponses des clones aux traitements toxiques que le critère SN.

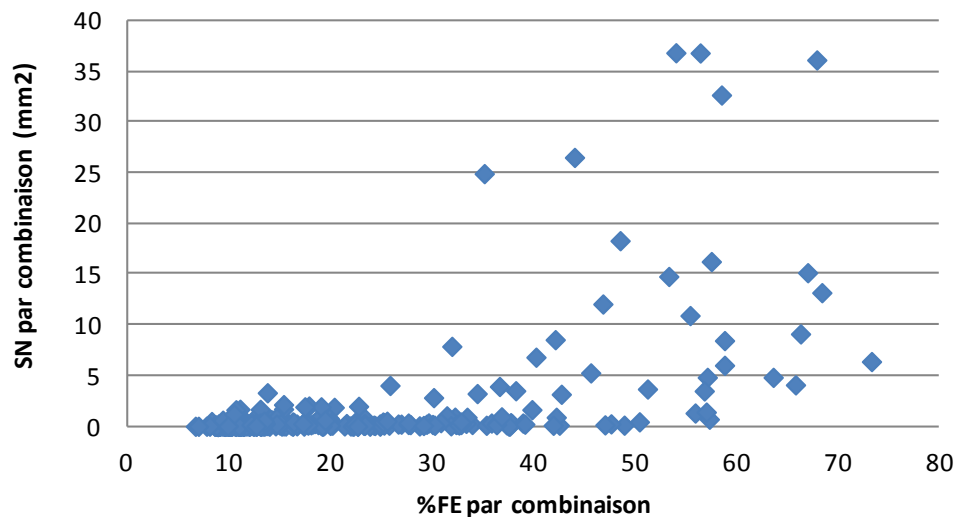


Fig 3.5:
Expérience CF.
Relation entre les
critères %FE et
SN, pour 331
combinaisons de
26 clones x 17
traitements. (cf
Tab 3-13)

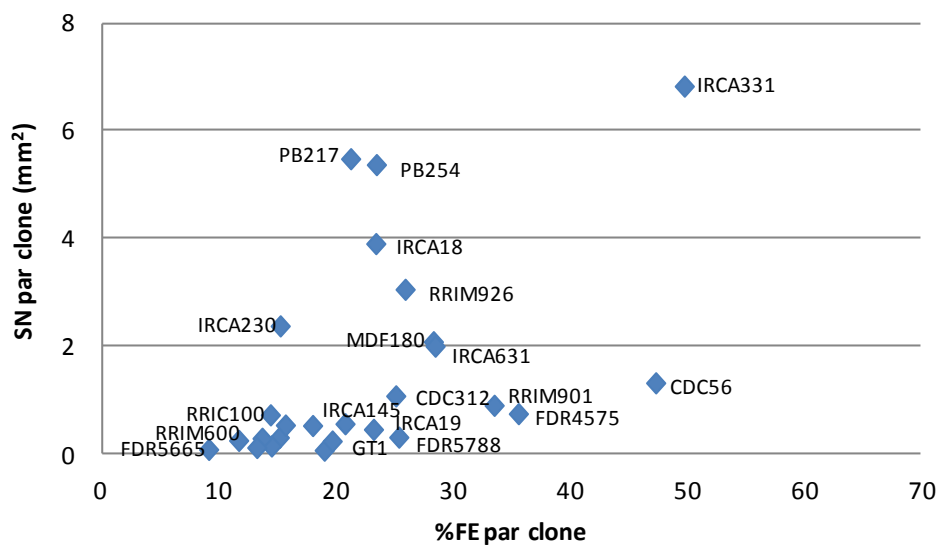


Fig 3.6:
Expérience CF.
Relation entre les
critères %FE et
SN. Moyennes
par clone. (cf Tab
3-13)

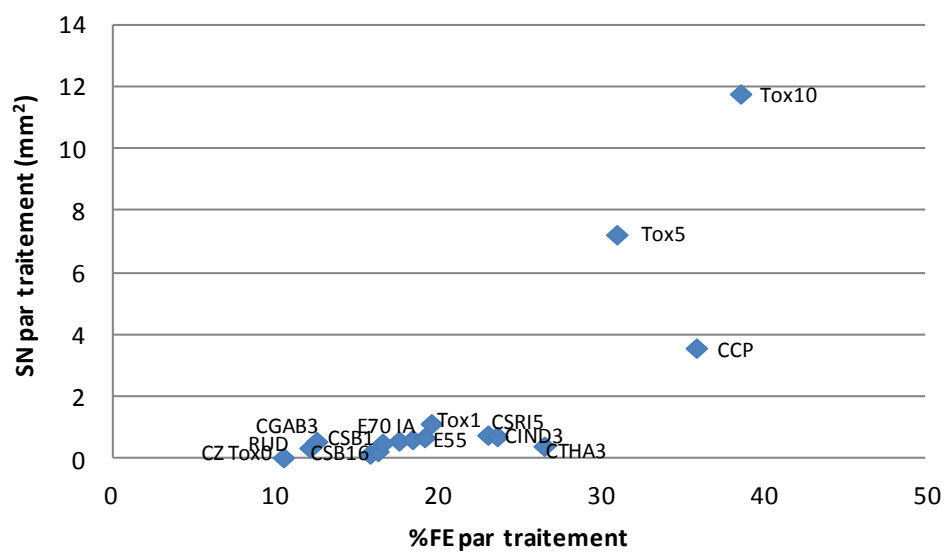


Fig 3.7:
Expérience CF.
Relation entre les
critères %FE et
SN. Moyennes
par traitement. (cf
Tab 3-13)

La représentation graphique portant sur les moyennes par clone (Fig 3.6) montre que seuls les clones les plus sensibles (IRCA230, IRCA631, RRIM926, IRCA18 PB254, PB217 et IRCA331) pouvaient être distingués des autres selon le critère SN, alors que la différenciation des clones selon le critère %FE était générale. Enfin, la représentation graphique portant sur les moyennes par traitement montre clairement que le critère SN ne permettait pas de différencier les traitements entre eux, à l'exception de CCP, Tox5 et Tox10 pour lesquels des valeurs SN élevées pouvaient être observées (Fig 3.7).

3.2.1.2 Expérience menée en Côte d'Ivoire (CI)

Les combinaisons communes entre les deux critères %FE et SN pour l'expérience menée en Côte d'Ivoire portaient sur 20 clones x 15 traitements, avec au moins trois répétitions par combinaison. La série de traitements incluait les trois concentrations de cassiicoline Cas1 purifiée (Tox1, Tox5 et Tox10), les filtrats de culture de 10 isolats de *Corynespora* d'origines géographiques et de types variés, et les deux traitements à blanc (Cz et Tox0).

Sur le Tab 3-14, on observe que les variations %FE et SN dans la matrice clone x traitement sont assez similaires. La Fig 3.8 portant sur la comparaison des critères %FE et SN pour chacune des 300 combinaisons présentait un nuage de points modélisable par une équation de régression linéaire. On a trouvé une corrélation positive forte entre les données des deux critères ($r = 0.80$). La Fig 3.9 portant sur les moyennes par clone met en évidence une corrélation positive forte entre %FE et SN ($r = 0.67$). Cette corrélation est cependant perturbée par les positions des trois clones IRCA303, GT1 et FDR5240. La Fig 3.10 portant sur les moyennes par traitement met en évidence une corrélation positive très forte entre %FE et SN pour les moyennes des 15 traitements toxiques ($r = 0.95$).

Dans cette expérience, les deux critères %FE et SN paraissent donc corrélés positivement. Cependant on note que la valeur maximale de SN (5 mm²) est ici très faible ce qui a rendu la mesure particulièrement difficile. On a donc choisi de privilégier la mesure du critère %FE pour estimer les réponses des clones aux traitements toxiques.

Tableau 3-14. Expérience CI. Réponses en %FE et en SN de 20 clones à 15 traitements.

Les valeurs présentées sont les moyennes d'au moins trois répétitions biologiques. Les couleurs représentent le gradient des valeurs de %FE et SN, des plus fortes (rouge) aux plus faibles (vert). Classement croissant en %FE des clones et des traitements selon leurs moyennes par clone et par traitement.

Réponse %FE																
Type	Eau	Milieu culture	F1/Cas0	Cas1 (1ng/μL)	A4/Cas0	B4/Cas5	B4/Cas5	A4/Cas0	C/Cas1	C/Cas1	Cas1 (5ng/μL)	A4/Cas0	A4/Cas0	A4/Cas0	Cas1 (10ng/μL)	
Clone	Tox0	Cz	CTHA3	Tox1	CLN16	TSB1	CSB16	CIND3	CCAM3	CCP	Tox5	CSRI5	CCII3	CCI6	Tox10	Moy./ clone
IRCA18	11	11	11	19	13	15	10	12	11	48	56	12	13	11	68	21
FDR5240	12	18	20	18	19	25	17	18	21	19	30	23	22	37	25	22
IRCA41	13	11	22	20	26	17	22	29	39	24	35	13	35	15	43	24
IRCA145	12	13	14	33	23	16	12	23	23	51	62	32	20	25	65	28
RRIM600	21	15	22	20	29	29	34	35	41	30	29	42	42	36	29	30
GT1	31	38	36	25	30	33	39	38	40	35	39	39	41	37	39	36
FDR5665	17	21	19	30	37	30	25	47	42	33	28	48	56	64	44	36
MDX624	21	18	21	16	28	26	23	41	55	31	38	55	62	87	44	38
CD1174	24	28	22	17	29	27	35	36	55	43	22	73	78	78	41	41
RRIC100	19	18	27	25	37	31	48	39	55	36	54	60	49	44	83	42
MDX607	24	22	45	37	38	21	34	37	43	42	46	62	42	75	79	43
PB217	19	18	45	45	41	47	41	43	44	63	59	41	42	42	76	44
IRCA303	29	28	64	44	29	50	51	40	42	43	33	47	45	74	46	45
RRIM901	14	23	25	22	35	26	24	31	58	53	51	79	77	81	72	45
IRCA19	15	19	18	53	29	23	34	35	54	65	72	50	51	63	89	45
PB254	22	22	38	55	33	44	61	47	51	84	87	45	57	57	88	53
PB260	12	24	35	43	39	43	56	49	67	64	72	70	73	75	92	54
FDR5788	18	24	28	29	39	43	44	42	86	82	70	70	78	90	87	55
FDR4575	37	41	43	45	45	56	51	54	69	68	54	93	96	93	73	61
RRIM926	14	32	47	42	43	54	48	69	84	74	78	91	94	94	77	63
Moy./ trait.	19	22	30	32	32	33	36	38	49	50	51	52	54	59	63	41

Réponse SN (en mm ²)																
Type	Eau	Milieu culture	F1/Cas0	Cas1 (1ng/μL)	A4/Cas0	B4/Cas5	B4/Cas5	A4/Cas0	C/Cas1	C/Cas1	Cas1 (5ng/μL)	A4/Cas0	A4/Cas0	A4/Cas0	Cas1 (10ng/μL)	
Clone	Tox0	Cz	CTHA3	Tox1	CLN16	TSB1	CSB16	CIND3	CCAM3	CCP	Tox5	CSRI5	CCII3	CCI6	Tox10	Moy./ clone
IRCA18	0	0	1	2	0	0	0	0	0	1.5	2.5	0	0	0.5	5	0.8
FDR5240	0	1	0.7	0.7	1	1.7	2	1.7	1.7	1.7	1.3	1.3	2	1.3	2.3	1.4
IRCA41	0	0.7	1	0	0.3	0.7	1	1	0.7	1	1.3	1	0.7	1	1.7	0.8
IRCA145	0	0	0	0.8	0	0	0	0	0	3	3.4	0	0	0	3.6	0.7
RRIM600	0.3	0.7	1	0	0	0.7	2.3	1	1	1	0.7	1	1	1	1.3	0.9
GT1	0.2	0	0.3	0	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4
FDR5665	0	0.3	1	0.7	0.3	1.3	0.7	1	1.7	1.7	1.3	2.3	3	2.3	2	1.3
MDX624	0.3	0.3	1	0.7	1	1	1	1	2	2.7	2	2	1.7	3.3	2.3	1.5
CD1174	0.3	0.3	0.7	0.7	0.3	0.3	1.7	1	1.7	1	1.3	4.3	4.7	4.7	1.3	1.6
RRIC100	0	0	0.3	0.7	0.3	1	1	1	1.7	2	2	1.3	1.7	1	3.3	1.2
MDX607	0	0	2.3	2	0.7	1	0.7	0.7	2	3	3.3	2.7	1.3	3.3	2.7	1.7
PB217	0	0	1	1.3	1	1	1	1	1.3	3	3.2	1	1.3	1	3.3	1.4
IRCA303	0	0.3	0.3	0	0	0	0.3	0.3	0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
RRIM901	0	0.5	0.7	0.8	0.5	0.7	0.8	0.7	2.7	3.5	2.5	3.2	3.2	3.5	4.5	1.9
IRCA19	0	0.3	0.3	2	0.3	0.7	1	1	2	3	3.7	1.7	2.3	2.3	4.7	1.7
PB254	0	1	0.7	1.7	0.3	1	2	1	1.3	3	2.7	0.7	1.3	1.3	4.7	1.5
PB260	0	0.3	0.8	1.7	0.7	0.8	1.5	0.5	2.5	3.8	4	0.8	1.8	2	5	1.8
FDR5788	0.7	0.7	1	0.7	1	1	2	1.3	2.7	2.7	2.7	2.7	2	5	3.7	2
FDR4575	0.3	0.7	1	1.3	1	1.3	2.3	1.7	1.3	3	3	3.3	4	5	3	2.2
RRIM926	0	0.3	1	1.3	0.7	1	1	1	2.3	3.7	3.3	4	4.3	4.7	4	2.2
Moy./ trait.	0.1	0.4	0.8	1	0.5	0.8	1.1	0.9	1.5	2.3	2.3	1.7	1.9	2.2	3	1.4

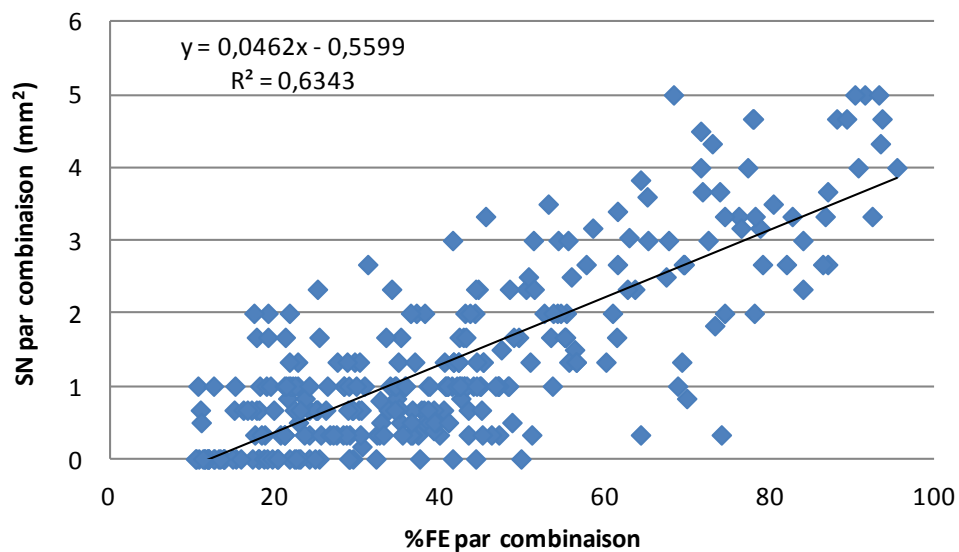


Fig 3.8:
Expérience CI.
Relation entre les
critères %FE et
SN, pour les 300
combinaisons de
20 clones x 15
traitements (cf Tab
3-14).

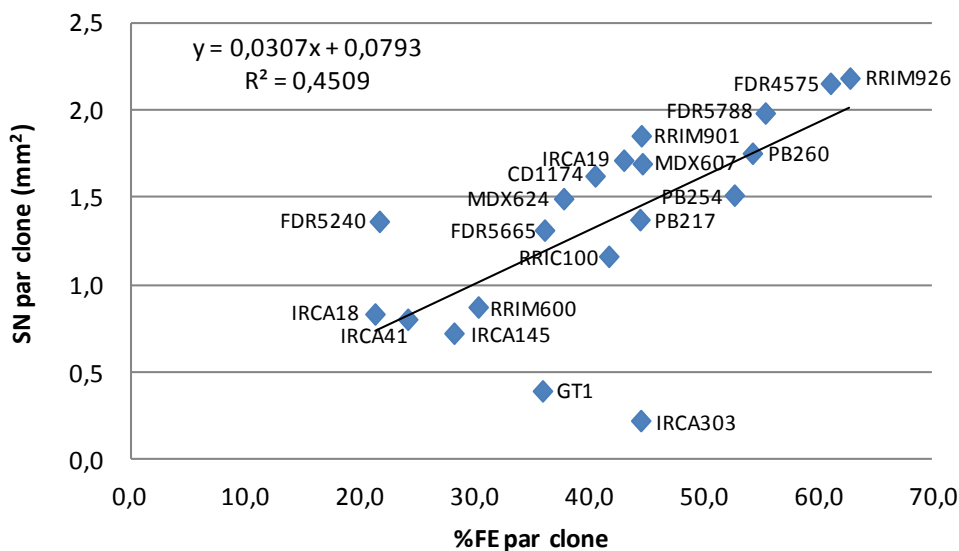


Fig 3.9:
Expérience CI.
Relation entre les
critères %FE et
SN. Moyennes
par clone. (cf Tab
3-14).

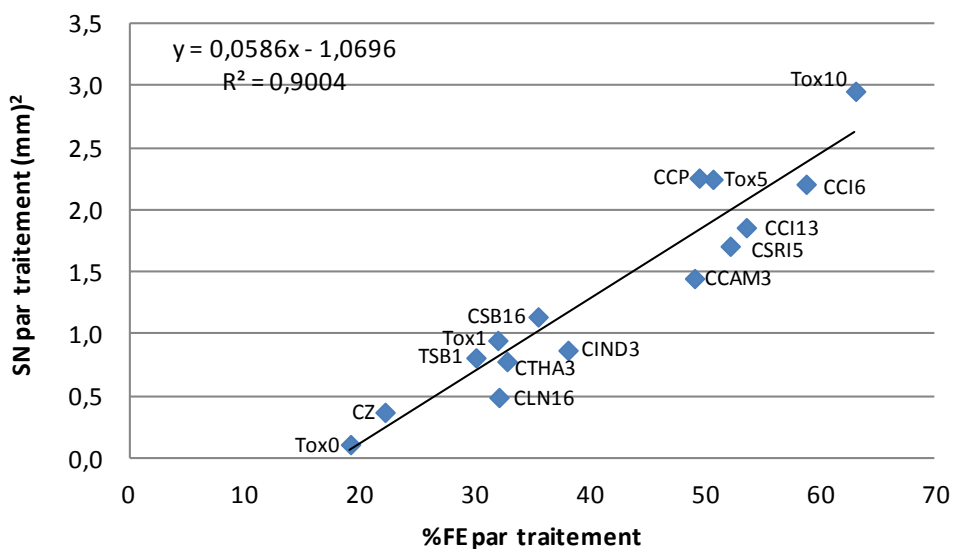


Fig 3.10:
Expérience CI.
Relation entre les
critères %FE et
SN. Moyennes
par traitement. (cf
Tab 3-14).

Tableau 3-15. Pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE) en réponse de 19 clones à 11 traitements, pour les deux expériences CF et CI.

Les couleurs représentent le gradient des valeurs de %FE au sein de chaque jeu de données, des plus fortes (rouge) aux plus faibles (vert). Classement croissant des clones de haut en bas selon leur réponse moyenne sur l'ensemble des traitements (moyenne par clone) et classement croissant des filtrats de gauche à droite selon leur réponse moyenne sur l'ensemble des clones (moyenne par traitement) dans l'expérience CI.

Expérience CF (%FE)													Expérience CI (%FE)												
Type	Eau	Milieu culture	F1/Cas0	Cas1 (1ng/μL)	A4/Cas0	B4/Cas5	A4/Cas0	C/Cas1	Cas1 (5ng/μL)	A4/Cas0	Cas1 (10ng/μL)	Moy./ clone	Type	Eau	Milieu culture	F1/Cas0	Cas1 (1ng/μL)	A4/Cas0	B4/Cas5	A4/Cas0	C/Cas1	Cas1 (5ng/μL)	A4/Cas0	Cas1 (10ng/μL)	Moy./ clone
Clone	Tox0	Cz	CTHA3	Tox1	CLN16	CSB16	CIND3	CCP	Tox5	CSR15	Tox10		Clone	Tox0	Cz	CTHA3	Tox1	CLN16	CSB16	CIND3	CCP	Tox5	CSR15	Tox10	
FDR5240	10	10	25	10	9	9	10	10	10	9	13	12		12	18	20	18	19	17	18	19	30	23	25	20
IRCA41	11	9	20	15	11	11	11	17	25	11	53	18		13	11	22	20	26	22	29	24	35	13	43	23
IRCA18	11	9	16	38	18	12	30	55	49	22	44	29		11	11	11	19	13	10	12	48	56	12	68	24
RRIM600	10	10	22	14	12	12	11	11	13	13	12	13		21	15	22	20	29	34	35	30	29	42	29	28
MDX624	8	9	13	11	13	13	23	16	12	18	19	15		21	18	21	16	28	23	41	31	38	55	44	31
IRCA145	8	10	20	13	13	11	11	23	34	23	41	20		12	13	14	33	23	12	23	51	62	32	65	31
FDR5665	9	9	14	7	9	9	9	7	7	8	11	9		17	21	19	30	37	25	47	33	28	48	44	32
CD1174	9	9	15	9	20	16	23	10	13	37	17	17		24	28	22	17	29	35	36	43	22	73	41	34
GT1	11	13	50	9	13	13	33	12	11	13	10	18		31	38	36	25	30	39	38	35	39	39	39	35
RRIM901	8	14	38	26	30	25	33	66	43	48	62	38		14	23	25	22	35	24	31	53	51	79	72	39
RRIC100	10	9	17	12	12	9	13	34	19	11	26	16		19	18	27	25	37	48	39	36	54	60	83	41
MDX607	9	8	23	9	24	16	12	9	11	10	19	14		24	22	45	37	38	34	37	42	46	62	79	42
IRCA19	11	10	36	33	12	11	11	57	44	12	61	29		15	19	18	53	29	34	35	65	72	50	89	44
PB217	12	9	18	15	11	11	11	51	54	15	56	25		19	18	45	45	41	41	43	63	59	41	76	45
FDR5788	13	9	42	15	37	38	49	17	17	47	15	29		18	24	28	29	39	44	42	82	70	70	87	48
PB260	12	NA	NA	19	NA	NA	NA	NA	31	NA	49	33		12	24	35	43	39	56	49	64	72	70	92	51
PB254	10	9	31	46	12	12	11	42	58	10	68	30		22	22	38	55	33	61	47	84	87	45	88	53
FDR4575	11	17	39	16	33	25	57	64	46	56	73	43		37	41	43	45	45	51	54	68	54	93	73	55
RRIM926	8	10	13	19	40	28	53	59	37	47	40	34		14	32	47	42	43	48	69	74	78	91	77	56
Moy./ trait.	10	10	25	18	18	16	23	31	28	23	36	23		19	22	30	32	32	36	38	50	51	52	63	38

3.2.2 Comparaison des expériences CF et CI

On présente ici une comparaison des résultats obtenus pour le critère %FE dans les expériences CF et CI afin d'apprécier la répétabilité du test toxinique.

Le Tab 3-15 présente les %FE en réponse de 19 clones à 11 traitements dans les deux expériences. Les %FE mesurés dans l'expérience CI (moyenne 38 %) étaient supérieurs aux valeurs obtenues dans l'expérience CF (moyenne 23 %)

La Fig 3.11 présente les distributions de %FE dans les deux expériences pour une même matrice de résultats obtenue à partir de 19 clones et 11 traitements toxiques. La distribution apparaît mieux répartie dans l'expérience CI que dans l'expérience CF.

La Fig 3.12 représente les 209 combinaisons clone x traitement pour les expériences CF et CI. Le nuage de points ne paraissait pas adapté à une modélisation par une équation de régression linéaire. Ceci était dû au fait qu'un nombre important de combinaisons clone x traitement montrait une bonne variabilité de réponse dans l'expérience CI mais une réponse uniformément faible dans l'expérience CF.

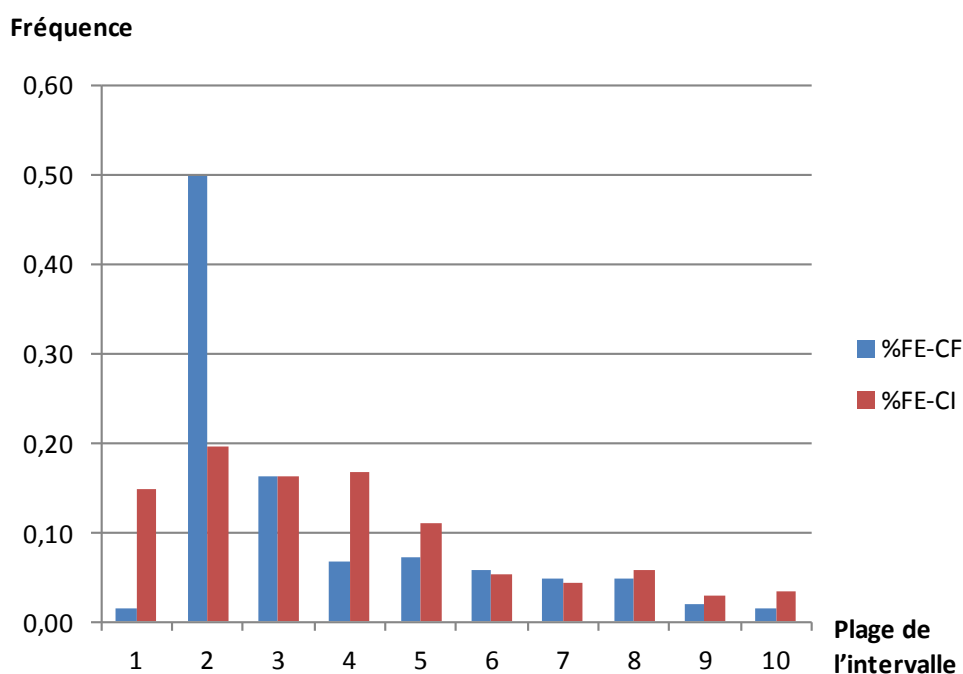


Fig 3.11: Comparaison des distributions du critère %FE pour les deux expériences CF et CI. Matrice de combinaisons de 19 clones et 11 traitements (cf Tab 3-15). Pour chaque distribution, la plage de variation totale a été découpée en 10 intervalles égaux. Expérience CF : %FE max = 74 % ; Expérience CI : %FE max = 93 %).

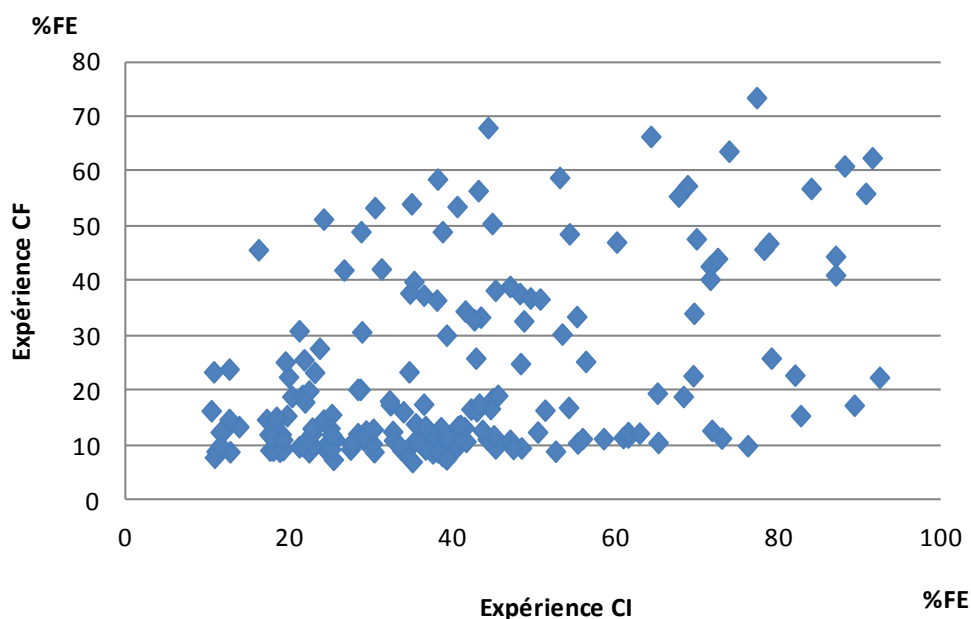


Fig 3.12: Relation entre les données %FE des deux expériences CF et CI, en %FE pour combinaisons de 19 clones x 11 traitements. (cf Tab 3-15).

On a donc examiné les résultats moyens d'abord par clone (Tab 3-16 et Fig 3.13), ensuite par traitement (Tab 3-17 et Fig 3.14).

- Le Tab 3-16 présente les moyennes par clone de 11 traitements pour les deux expériences CF et CI. La valeur moyenne %FE de l'ensemble des 11 traitements de l'expérience CI était toujours supérieure à celle de l'expérience CF, avec un ratio maximum de 3.5 pour le clone FDR5665. La corrélation entre les deux séries de moyennes ($r = 0.76$) était hautement significative (seuil de signification $r = 0.57$ pour $\alpha = 0.01$ avec $dl = 17$) (Fig 3.13).
- Le Tab 3-17 présente les moyennes par traitement toxinique de 19 clones pour les deux expériences CF et CI. Comme dans le cas précédent, les valeurs de l'expérience CI sont supérieures à celles de l'expérience CF, avec un ratio maximum de 2.3 pour le traitement toxinique CSRI5 et CSB16. La Fig 3.14 montre une corrélation positive hautement significative ($r = 0.94$) entre les moyennes de l'expérience CF et celles de l'expérience CI pour les traitements.

La comparaison entre les données des deux expériences pour chacun des clones (Tab 3-18) ou pour chacun des traitements (Tab 3-19) a donné des résultats variables selon les clones ou les traitements. On observe, selon les clones et les traitements, des corrélations positives ou non significatives.

Tableau 3-16. Moyennes par clone des 11 traitements toxiques pour les deux expériences CF et CI. Moyennes par expérience et moyennes des deux expériences. Ratio %FE-CI / %FE-CF.

Clone	%FE-CF	%FE-CI	%FE moyen de deux expériences CF et CI	Ratio CI/CF
FDR5240	12	20	16	1.7
IRCA41	18	23	21	1.3
IRCA18	29	24	27	0.8
RRIM600	13	28	20	2.2
MDX624	15	31	23	2.1
IRCA145	20	31	25	1.6
FDR5665	9	32	20	3.5
CD1174	17	34	25	2.0
GT1	18	35	27	2.0
RRIM901	38	39	39	1.0
RRIC100	16	41	28	2.5
MDX607	14	42	28	3.0
IRCA19	29	44	36	1.5
PB217	25	45	35	1.8
FDR5788	29	48	39	1.7
PB260	33	51	42	1.5
PB254	30	53	41	1.8
FDR4575	43	55	49	1.3
RRIM926	34	56	45	1.6
Moyenne	23	38	31	2.0

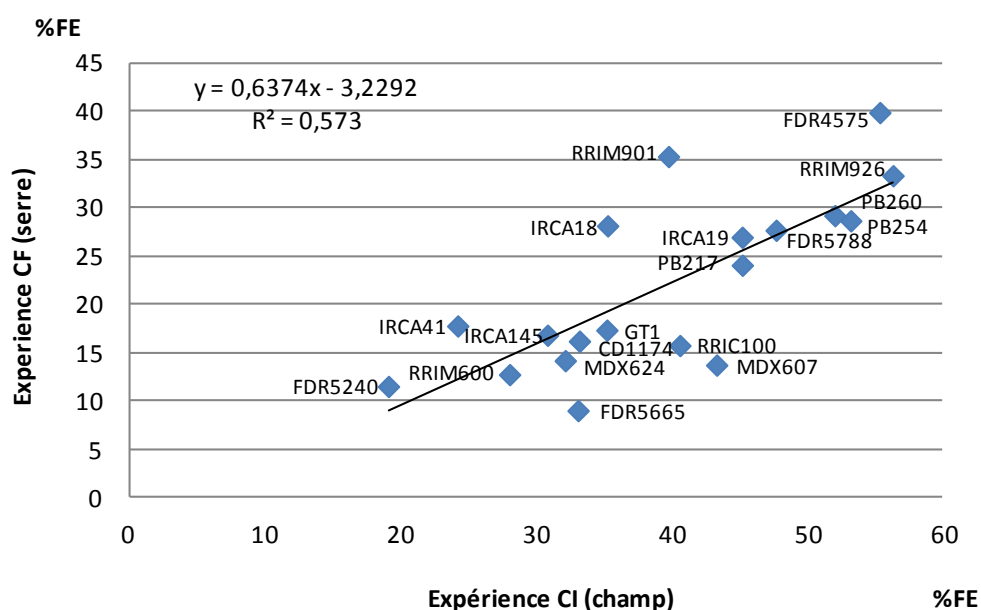


Fig 3.13: Corrélation entre les valeurs %FE des deux expériences CF et CI pour les moyennes par clone de 11 traitements ($r = 0.76$, seuil de signification $r_s = 0.57$ pour $\alpha = 0.01$).

Tableau 3-17. Moyennes par traitement toxinique de 19 clones pour les deux expériences CF et CI. Moyennes par expérience et moyennes des deux expériences. Ratio %FE-CI / %FE-CF.

Traitement	%FE-CF	%FE-CI	%FE moyen de deux expériences CF et CI	Ratio CI/CF
Tox0	10	19	15	1.9
Cz	10	22	16	2.2
CTHA3	25	30	28	1.2
Tox1	18	32	25	1.8
CLN16	18	32	25	1.8
CSB16	16	36	26	2.3
CIND3	23	38	30	1.7
CCP	31	50	40	1.6
Tox5	28	51	39	1.8
CSRI5	23	52	37	2.3
Tox10	36	63	50	1.7
Moyenne	22	39	30	2.0

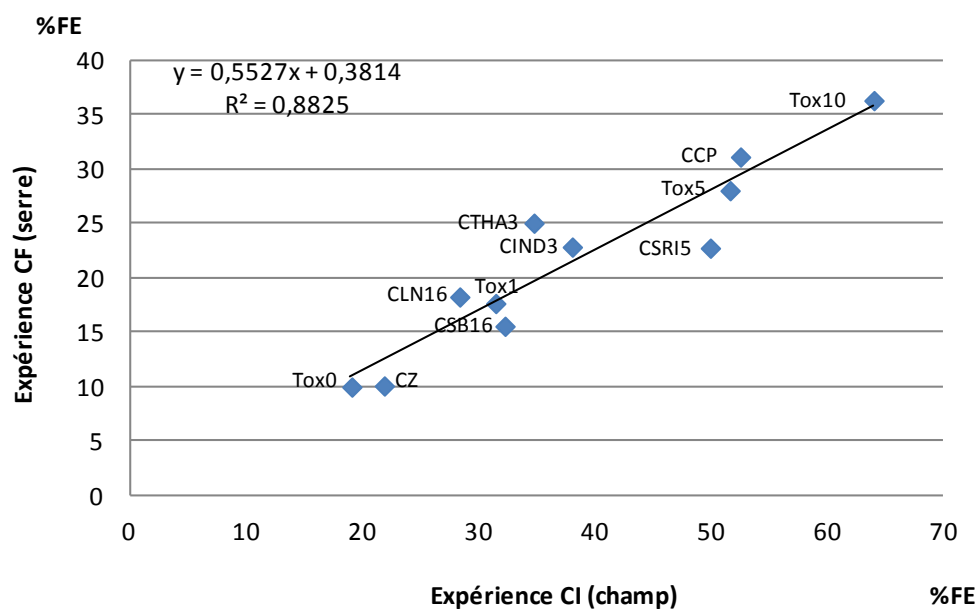


Fig 3.14: Corrélation entre les expériences CF et CI pour les moyennes %FE par traitement toxinique de 19 clones ($r = 0.94$, seuil de signification $r_s = 0.73$ pour $\alpha = 0.01$).

Tableau 3-18. Corrélations entre les réponses aux 11 traitements dans les deux expériences CF et CI entre les moyennes par traitement toxinique pour chacun des 19 clones.
%FE moyen des deux expériences et coefficient de corrélation r (ns = non significatif pour $\alpha = 0.05$, seuil de signification $r_s = 0.60$).

Clone	%FE moyen de deux expériences	r
FDR5240	16	0.70
IRCA41	21	ns
IRCA18	27	ns
RRIM600	20	0.83
MDX624	23	0.86
IRCA145	25	0.67
FDR5665	20	0.87
CD1174	25	0.74
GT1	27	0.60
RRIM901	39	ns
RRIC100	28	0.85
MDX607	28	0.85
IRCA19	36	0.63
PB217	35	0.75
FDR5788	39	0.70
PB260	42	ns
PB254	41	0.71
FDR4575	49	0.73
RRIM926	45	0.80

Tableau 3-19. Corrélations entre les réponses des 19 clones dans les deux expériences CF et CI pour chacun des 11 traitements.
%FE moyen des deux expériences et coefficient de corrélation r (ns = non significatif pour $\alpha = 0.05$, seuil de signification $r_s = 0.47$).

Traitement	%FE moyen de deux expériences	r
Tox0	15	ns
Cz	16	0,62
CTHA3	28	0,77
Tox1	25	ns
CLN16	25	0,82
CSB16	26	0,84
CIND3	30	0,79
CCP	40	0,86
Tox5	39	0,71
CSRI5	37	0,74
Tox10	50	0,58

Tableau 3-20. Expérience CF. Pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE) mesuré sur 27 clones en réponse à 17 traitements.

Traitements : toxine Cas1 purifiée à 1, 5 et 10 ng/μL (respectivement Tox1, Tox5 et Tox10), filtrats de 12 souches de *Corynespora* et deux traitements à blanc (milieu de culture Cz et eau Tox0).

Les couleurs représentent le gradient des valeurs de %FE, des plus fortes (rouge) aux plus faibles (vert). Classement croissant des clones de haut en bas selon la moyenne par clone. Classement croissant des filtrats de gauche à droite selon la moyenne par traitement. 'NA' : donnée non disponible.

	Milieu culture																	Moyenne/ clone
	Eau	A/Cas2+6	A3/Cas0	B4/Cas5	B4/Cas5	?/Cas3	A/Cas2	A4/Cas0	G/Cas0	Cas1 (1ng/μL)	A4/Cas0	A4/Cas0	F1/Cas0	Cas1 (5ng/μL)	C/Cas1	Cas1 (10ng/μL)		
Clone	Cz	Tox0	RUD	CGAB3	CSB16	CSB1	E70	IA	CLN16	E55	Tox1	CSRI5	CIND3	CTHA3	Tox5	CCP	Tox10	
FDR5665	9	9	11	7	9	12	9	8	9	10	7	8	9	14	7	7	11	9
FDR5240	10	10	8	10	9	11	11	12	9	19	10	9	10	25	10	10	13	12
RRIM600	10	10	10	13	12	19	13	15	12	12	14	13	11	22	13	11	12	13
MDX624	9	8	11	11	13	11	13	14	13	11	11	18	23	13	12	16	19	13
MDX607	8	9	22	10	16	17	10	16	24	15	9	10	12	23	11	9	19	14
RRIC100	9	10	10	10	9	17	14	9	12	9	12	11	13	17	19	34	26	14
CD1174	9	9	16	12	16	12	11	11	20	12	9	37	23	15	13	10	17	15
IRCA230	11	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14	NA	NA	NA	20	13	18	15
IRCA41	9	11	10	11	11	13	10	9	11	14	15	11	11	20	25	17	53	15
FDR5802	NA	9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9	NA	NA	NA	19	NA	29	17
IRCA145	10	8	9	13	11	15	19	20	13	15	13	23	11	20	34	23	41	17
GT1	13	11	16	16	13	38	32	13	13	21	9	13	33	50	11	12	10	19
PMB1	11	9	11	11	14	11	15	29	11	27	NA	11	21	32	NA	66	NA	20
PB217	9	12	10	11	11	13	14	18	11	23	15	15	11	18	54	51	56	21
IRCA19	10	11	11	9	11	17	13	16	12	17	33	12	11	36	44	57	61	22
CDC312	NA	10	10	12	16	9	11	32	NA	31	NA	36	28	42	NA	33	NA	22
PB254	9	10	12	11	12	15	11	13	12	14	46	10	11	31	58	42	68	23
IRCA18	9	11	11	11	12	24	12	10	18	12	38	22	30	16	49	55	44	23
FDR5788	9	13	9	13	38	13	26	27	37	33	15	47	49	42	17	17	15	25
RRIM926	10	8	9	12	28	13	12	9	40	14	19	47	53	13	37	59	40	25
IRCA631	9	9	10	9	14	13	11	13	25	9	43	39	38	20	59	73	68	27
MDF180	19	11	24	22	25	34	35	32	23	30	19	12	22	38	28	57	35	27
PB260	NA	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	19	NA	NA	NA	31	NA	49	28
RRIM901	14	8	19	19	25	12	27	32	30	42	26	48	33	38	43	66	62	32
FDR4575	17	11	10	23	25	15	36	29	33	30	16	56	57	39	46	64	73	34
IRCA331	NA	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	25	NA	NA	NA	57	NA	67	40
CDC56	9	11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	43	NA	NA	NA	59	58	68	41
Moyenne/ traitement	11	10	12	13	16	16	17	18	18	19	20	23	24	27	31	36	39	21

3.2.3 *Caractérisation de la réponse des combinaisons clone x traitement au test toxinique selon le critère %FE*

3.2.3.1 *Expérience réalisée en France (plantes en serre)*

Le Tab 3-20 présente les valeurs moyennes de %FE pour l'expérience CF, soit 390 combinaisons obtenues à partir de 27 clones et 17 traitements. La colorisation différentielle de ce tableau met en évidence l'intensité croissante de la réponse des différentes combinaisons du haut en bas et de gauche à droite du tableau selon la sensibilité des clones et l'agressivité des traitements. On a vu précédemment que la distribution des données était fortement dissymétrique, avec une fréquence élevée de valeurs faibles : le mode de la distribution était très inférieur à la médiane. On a donc choisi de présenter d'abord les résultats sous la forme simple de moyennes arithmétiques non ajustées de l'effet des données manquantes. On propose ensuite une prédiction des valeurs des différentes combinaisons à partir d'un modèle de régression linéaire, dans le but d'estimer les effets principaux des clones et des traitements, ainsi que les écarts d'interaction clone x traitement.

Les moyennes arithmétiques %FE varient de 7 à 73 % sur l'ensemble des 390 combinaisons, avec une moyenne générale de 21 %, une variation continue de 9 à 41 % selon les clones et de 11 à 39 % selon les traitements. On vérifie que les traitements à blanc Tox0 et Cz montrent la plus faible agressivité. On vérifie également que l'intensité de la réponse des clones à la cassiicoline Cas1 augmente avec la concentration en toxine (colonnes grisées Tox0, Tox1, Tox5 et Tox10) et donc que les données sont cohérentes avec le principe de la réponse au test toxinique. L'agressivité moyenne du filtrat CCP sur les 27 clones est intermédiaire entre celles des traitements Tox5 et Tox10, et les profils de sensibilité clonale des trois traitements sont similaires.

Deux classifications ascendantes hiérarchiques portant sur les 390 combinaisons ont permis de faire apparaître une double structure : les 17 traitements toxiques ont été regroupés en trois clusters (Tr1, Tr2 et Tr3) et les 27 clones en trois clusters également (CL1, CL2 et CL3) (Fig 3.15).

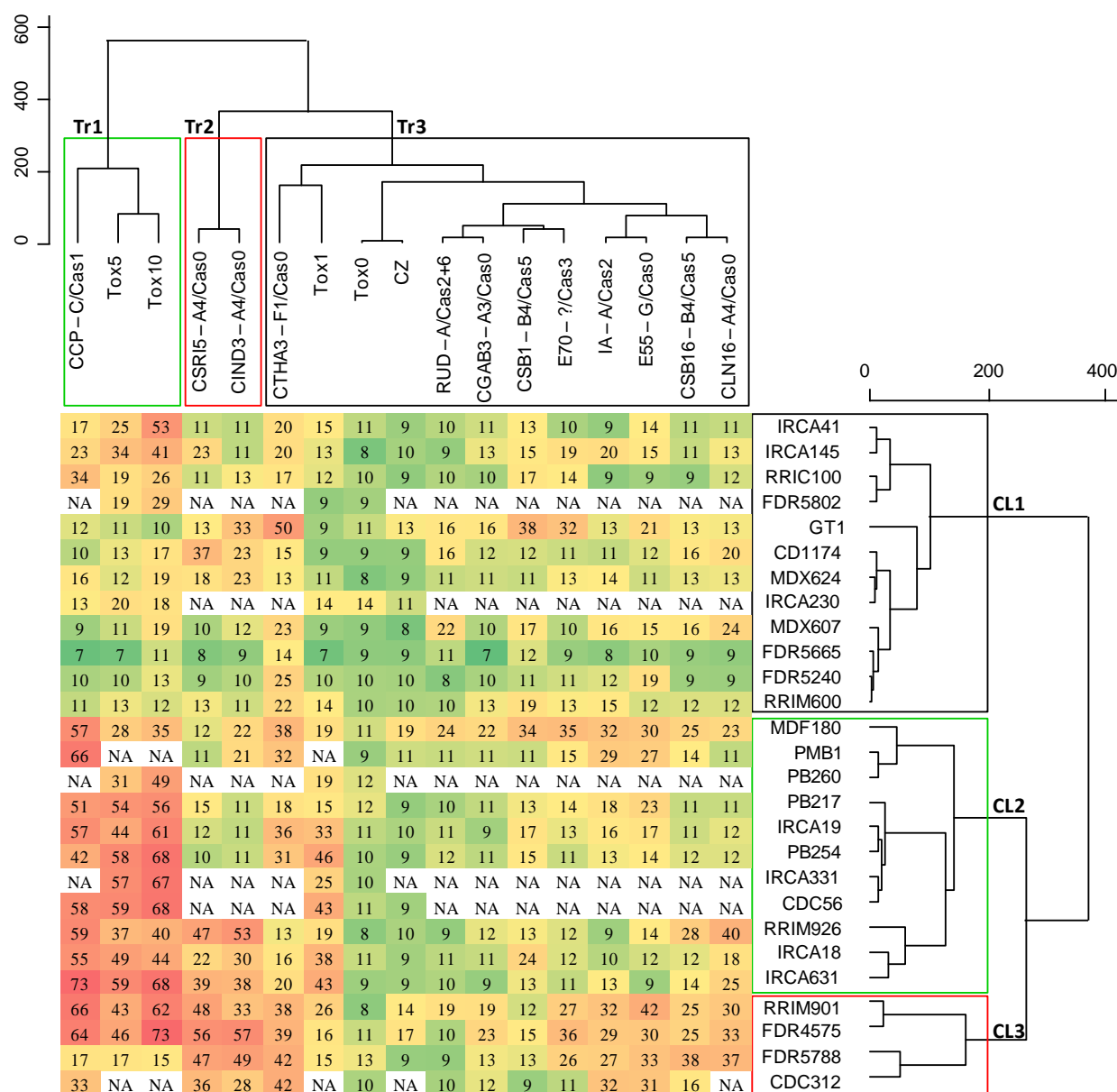


Fig 3.15: Expérience CF. Classification des clones (CL) et des traitements (Tr) d'après le critère %FE mesuré sur 27 clones en réponse à 17 traitements (cf Tab 3-20).

Classification ascendantes hiérarchiques réalisée d'après la distance euclidienne (dissimilarité), la méthode d'agrégation « ward » et la troncature automatique sur le logiciel R

Classification des 17 traitements toxiques selon leurs profils d'agressivité sur les 27 clones

- Le cluster Tr1 correspond aux traitements les plus agressifs à savoir la toxine Cas1 purifiée à 5 et 10 ng/μL et le filtrat de la souche d'origine CCP (type C/Cas1).
- Le cluster Tr2 correspond à deux traitements agressifs : les filtrats CSRI5 et CIND3, tous deux de type A4/Cas0.

- Le cluster Tr3 correspond aux 12 autres traitements, incluant les deux traitements à blanc (Tox0 et Cz), des filtrats peu agressifs et de types variés (F1/Cas0 ; A/Cas2+6 ; A3/Cas0 ; B4/Cas5 ; ?/Cas3 ; A/Cas2 ; G/Cas0 ; A4/Cas0 et la cassiicoline Cas1 purifiée à 1 ng/μL (Tox1). Bien que les différences soient relativement faibles au sein d'un même cluster, on peut distinguer au sein de ce cluster Tr3 six couples de traitements qui diffèrent entre eux par leurs agressivités moyennes et par leurs profils d'agressivité sur les différents clones : CTHA3 et Tox1 ; RUD et CGAB3, CSB1 et E70, IA et E55, CSB16 et CLN16, et les deux traitements à blanc Cz et Tox0.

Classification des 27 clones selon leurs profils de réponse aux 17 traitements

- Le cluster CL1 correspond à 12 clones globalement peu sensibles à la plupart des traitements: IRCA41, IRCA145, RRIC100, FDR5802, GT1, CD1174, MDX624, IRCA230, MDX607, FDR5665, FDR5240 et RRIM600. Le sous-cluster composé d'IRCA41, IRCA145, RRIC100 et FDR5802 présente tout de même une sensibilité assez importante aux traitements du cluster Tr1 (cassiicoline et CCP). Le clone GT1 est atypique, avec une sensibilité marquée à CTHA3.
- Les clusters CL2 et CL3 sont peu différenciés. Ils correspondent à 15 clones sensibles, notamment aux traitements toxiques CCP et Cas1 (Tr1). Le cluster CL3 semble présenter une sensibilité plus générale, y compris à des traitements peu agressifs comme E70, IA, E55, CSB16 et CLN16.

Une analyse de variance a été réalisée pour le critère %FE en considérant les clones et les traitements comme des effets aléatoires. En effet, ces clones et ces traitements n'ont pas été véritablement choisis, sinon pour représenter une bonne diversité de situations concernant les combinaisons clone x traitement. Le modèle statistique de cette analyse était le suivant :

$$Y_{ijk} (\%FE) = \mu + C_i + T_j + (\text{Interaction CxT})_{ij} + E_{ijk}$$

avec :

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| ✓ Y_{ijk} | : mesure de l'échantillon k pour le clone i et le traitement j |
| ✓ μ | : moyenne générale |
| ✓ C_i | : effet du clone i |
| ✓ T_j | : effet du traitement j |
| ✓ $(\text{Interaction CxT})_{ij}$ | : écart d'interaction |
| ✓ E_{ijk} | : erreur résiduelle |

Pour apprécier la validité de l'analyse, on a examiné la distribution des résidus (Fig 3.16). En fait, la distribution des résidus était symétrique, mais avec un excès de résidus nuls par comparaison avec une distribution normale. Cet excès est imputable à l'abondance de combinaisons clone x traitement montrant des réponses faibles dans cette expérience.

Cette analyse a permis de tester et d'estimer les effets principaux d'une part des clones et d'autre part des traitements, ainsi que l'effet d'interaction clone x traitement (Tab 3-21). Les effets « clone », « traitement » et « interaction clone x traitement » expliquent au total 69 % de la variance totale du modèle statistique avec des contributions respectives de 18, 21 et 30 % estimées d'après les valeurs des sommes des carrés des écarts.

Le Tab 3-22 présente les effets principaux des clones et des traitements, ainsi que les valeurs des écarts d'interaction significativement différents de zéro. Tous ces effets sont présentés en écarts à la moyenne générale. Les estimations des effets principaux diffèrent peu des moyennes arithmétiques présentées dans le Tab 3-20. Les estimations des effets des clones IRCA230, FDR5802, PB260, CDC312, IRCA331 et CDC56 sont à considérer avec prudence du fait du grand nombre de données manquantes pour ces clones. Parmi les 390 combinaisons clone x traitement testées, 28 seulement (7 %) ont présenté une interaction significative, dont 9 négatives (réponse globale inférieure à la somme des deux effets principaux) et 19 positives (réponse globale supérieure à la somme des deux effets principaux).

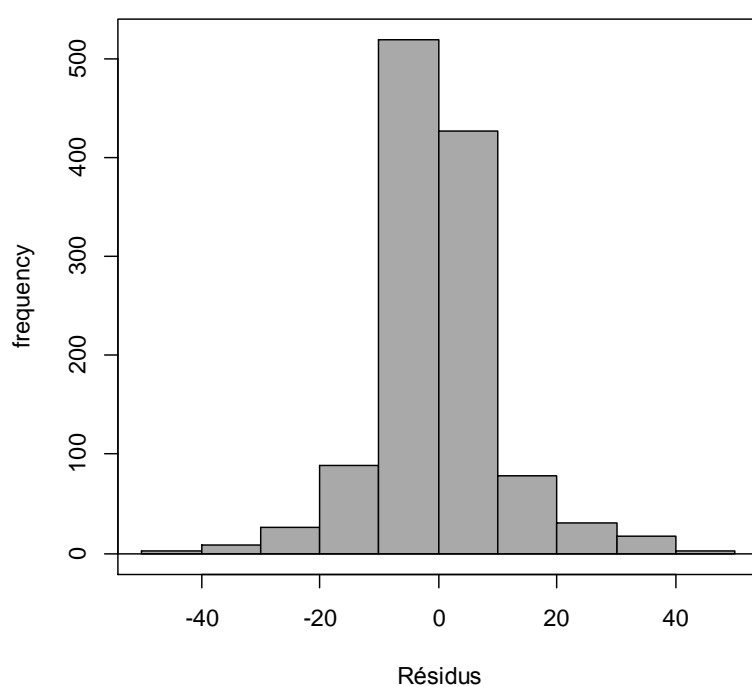


Fig 3.16: Expérience CF.
Distribution des résidus.
Analyse de variance de %FE.

Tableau 3-21. Expérience CF. Analyse de variance du critère %FE mesuré sur 27 clones en réponse à 17 traitements

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Clone	26	73587	2830.3	17.0	< 2.2e-16***	18
Traitement	16	85037	5314.8	31.9	< 2.2e-16***	21
Clone x Traitement	321	121554	378.7	2.3	< 2.2e-16***	30
Résidus	757	126058	166.5			31

dl : Degrés de liberté ; SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens ; Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité de F > de Fcritique: '****' 0.001 '***' 0.01 '*' 0.05

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport SCE sur SCE totaux

Tableau 3-22. Expérience CF. Effets principaux (clone et traitement) et effet interactif influençant le critère %FE, pour 27 clones et 17 traitements (cf Tab 3-21).

Calcul des prédicteurs Blup (Best Linear Unbiased Predictor) des effets. Seuls les écarts d'interaction significativement différents de zéro ne sont pas présentés. Le gradient de couleurs indique l'importance des écarts d'interaction du vert (négatif) au rouge (positif). 'NA' : donnée non disponible.

Type	Milieu culture	Eau	A/Cas2+6	A3/Cas0	B4/Cas5	B4/Cas5	?/Cas3	A/Cas2	A4/Cas0	G/Cas0	Cas1 (1ng/μL)	A4/Cas0	A4/Cas0	F1/Cas0	Cas1 (5ng/μL)	C/Cas1	Cas1 (10ng/μL)	Effect clone
Clone	Cz	Tox0	RUD	CGAB3	CSB16	CSB1	E70	IA	CLN16	E55	Tox1	CSRI5	CIND3	CTHA3	Tox5	CCP	Tox10	
FDR5665	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11
FDR5240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	-	-8
IRCA230	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	-	-	-	-8
RRIM600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	-7
MDX624	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-7
MDX607	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	-	-7
FDR5802	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	-	NA	-	-7
RRIC100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-6
CD1174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-14	-	-6
IRCA41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-5
IRCA145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3
GT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-11	-15	-2
PB217	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	0
PMB1	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	NA	14	NA	1
IRCA18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	2
PB260	-	-	NA	NA	-	NA	NA	NA	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	2
IRCA19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	2
CDC312	NA	NA	-	-	-	NA	-	-	NA	-	NA	-	-	-	NA	-	NA	3
FDR5788	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-14	3
PB254	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	19	3
RRIM926	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	16	-11	-	12	-	4
MDF180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
IRCA631	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	11	-	-	-	15	23	17	6
RRIM901	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	11
IRCA331	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	-	NA	-	12
FDR4575	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	13	-	-	-	-	12
CDC56	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	-	-	-	14
Effet/ trait.	-10	-10	-8	-8	-5	-5	-4	-4	-2	-2	-1	2	3	4	9	14	17	

Tableau 3-23. Expérience CI. Pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE) mesurés sur 20 clones en réponse à 25 traitements.

Traitements : toxine Cas1 à 1, 5 et 10 ng/μL (respectivement Tox1, Tox5 et Tox10), filtrats de 20 souches de *Corynespora* et deux traitements à blanc (Tox0 et Cz). 'NA' : donnée non disponible. CCP* : souche CCP déletée pour le gene *Cas1*. Les couleurs représentent le gradient des valeurs de %FE, des plus fortes (rouge) aux plus faibles (vert). Classement croissant des clones de haut en bas selon la moyenne par clone. Classement croissant des filtrats de gauche à droite selon la moyenne par traitement.

Type	Eau	Milieu culture	B4/Cas5	A4/Cas1	B4/Cas0	CF/Cas4	A4/Cas2	F1/Cas0	Cas1 (1ng/μL)	A4/Cas0	B4/Cas5	B4/Cas5	A4/Cas0	A4/Cas0	A4/Cas0	C/Cas0	C/Cas1	C/Cas1	C/Cas1	C/Cas1	Cas1 (5ng/μL)	A4/Cas0	A4/Cas0	A4/Cas0	Cas1 (10ng/μL)	Moy./ clone
Clone	Tox0	Cz	CCI416	CCI405	CCI449	CCI423	CCI402	CTHA3	Tox1	CLN16	TSB1	CSB16	CCI403	CIND3	CCI434	CCP*	CNIG404	CCAM3	CCP	CCI501	Tox5	CSRI5	CCI13	CCI6	Tox10	
IRCA41	13	11	14	15	12	15	12	22	20	26	17	22	14	29	14	14	23	39	24	15	35	13	35	15	43	21
IRCA18	11	11	NA	NA	NA	NA	NA	11	19	13	15	10	NA	12	NA	NA	NA	11	48	NA	56	12	13	11	68	21
FDR5240	12	18	26	32	37	26	33	20	18	19	25	18	31	18	31	32	31	21	19	36	30	23	22	37	25	26
RRIM600	21	15	14	17	18	24	14	23	20	29	30	34	13	35	23	23	19	41	30	31	29	42	42	36	29	26
IRCA145	12	13	NA	NA	NA	NA	NA	14	33	23	16	12	NA	23	NA	NA	NA	23	51	NA	62	32	20	25	65	28
FDR5665	17	21	13	18	14	15	31	20	30	37	30	25	24	47	30	27	12	42	34	18	28	49	56	64	44	30
MDX624	21	18	14	14	14	23	16	21	16	28	26	23	45	41	33	47	47	55	31	32	38	55	62	87	44	34
MDX607	24	22	16	23	22	25	23	45	37	38	21	34	25	37	25	32	25	43	42	41	46	62	42	75	79	36
CD1174	24	28	24	20	20	20	30	22	17	29	27	35	41	36	37	52	32	55	43	25	22	73	78	78	41	36
PB217	19	18	15	18	17	23	13	45	45	42	47	41	16	43	15	23	57	45	63	48	59	41	42	43	76	37
GT1	31	38	42	42	32	51	39	36	25	30	33	39	43	38	48	47	38	40	35	46	39	39	41	37	39	39
RRIC100	19	18	24	32	24	19	39	27	25	37	31	48	35	39	49	48	42	55	37	58	54	60	49	45	83	40
IRCA303	30	28	19	21	16	21	23	64	44	29	50	51	30	40	47	34	75	42	44	89	33	47	45	74	46	42
PB254	22	22	29	16	21	23	18	38	55	33	44	61	16	47	23	22	42	51	84	45	87	45	57	57	88	42
RRIM901	14	23	30	32	35	33	30	25	22	35	26	24	44	31	52	49	64	58	53	66	51	79	77	81	72	44
IRCA19	15	19	24	21	24	21	30	18	53	29	23	34	64	35	58	53	84	54	65	75	72	50	52	63	89	45
PB260	12	24	16	16	19	18	20	35	43	39	43	56	30	49	33	44	72	68	64	74	72	70	73	75	92	46
FDR5788	18	24	34	40	51	45	48	28	29	39	43	44	56	42	71	79	44	87	82	51	70	70	78	90	87	54
RRIM926	14	32	47	37	44	41	48	47	42	44	54	48	71	69	57	61	76	84	74	80	78	91	94	94	77	60
FDR4575	37	41	54	55	66	62	46	43	45	45	56	51	69	54	64	72	90	69	68	80	54	93	96	93	73	63
Moy/ traitement	19	22	25	26	27	28	29	30	32	32	33	36	37	38	39	42	48	49	50	51	51	52	54	59	63	39

3.2.3.2 Expérience en Côte d'Ivoire (en plantation)

Le Tab 3-23 présente les valeurs arithmétiques moyennes de %FE pour l'expérience CI, pour 480 combinaisons parmi 20 clones et 25 traitements. Ces valeurs varient de 10 à 96 %, avec une moyenne générale de 39 %. Comme pour l'expérience CF, l'intensité de la réponse des clones à la cassiicoline Cas1 augmente avec la concentration en toxine (colonnes grisées). Cependant, l'agressivité moyenne du filtrat CCP est ici légèrement inférieure à celle de Tox5 et Tox10, mais les profils de sensibilité clonale restent similaires pour les trois traitements.

Les deux classifications ascendantes hiérarchiques des 480 combinaisons ont permis de regrouper les traitements en trois clusters (Tr1, Tr2 et Tr3) et les clones également en trois clusters (CL1, CL2 et CL3) (Fig 3.17) :

Classification des 25 traitements selon leurs profils d'agressivité sur les 20 clones

- Le cluster Tr1 correspond aux traitements les plus agressifs (toxine Cas1 purifiée à 5 et 10 ng/μL et son filtrat d'origine CCP de type C/Cas1).
- Le cluster Tr2 regroupe les 9 traitements agressifs CCI6, CCAM3, CSRI5, CCI13, CCI403, CCI434, CCP muté, CNIG404, et CCI501, divisés en trois sous-clusters : l'un regroupe les traitements des types A4/Cas0 (traitements CCI6, CSRI5, CCI13) et C/Cas1 (CCAM3); le deuxième sous-cluster des traitements des types A4/Cas0 (CCI403, CCI434) et C/Cas0 (CCP*); enfin le troisième sous-cluster des traitements du type C/Cas1 (CNIG404 et CCI501).
- Le cluster Tr3 regroupe les deux traitements à blanc (Cz et Tox0) et les 11 traitements peu agressifs TSB1, CSB16, CLN16, CIND3, CTHA3, Tox1, CCI402, CCI449, CCI423, CCI405 et CCI416. Il est divisé en deux sous-clusters : l'un regroupe les filtrats faiblement agressifs TSB1, CSB16, CLN16, CIND3, CTHA3, de types B4/Cas5, A4/Cas0, et F1/Cas0, ainsi que Tox1 ; l'autre regroupe des traitements non agressifs tels que les traitements à blanc (Cz et Tox0) et les filtrats CCI402, CCI449, CCI423, CCI405 et CCI416, de type A4/Cas2, B4/Cas0, CF/Cas4 et A4/Cas1 et B4/Cas5 respectivement, tous originaires de Côte d'Ivoire.

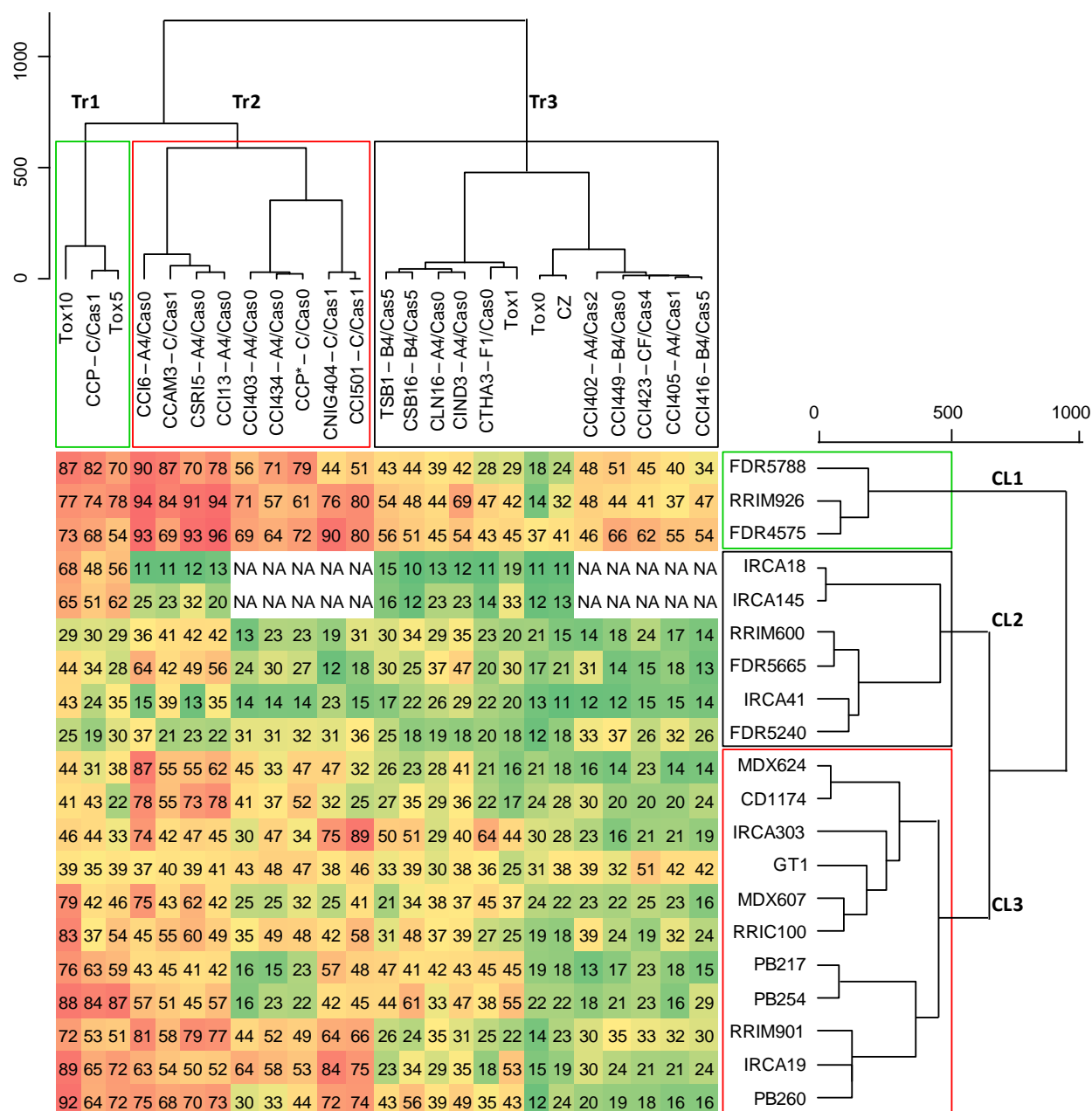


Fig 3.17: Expérience CI. Classification des clones (CL) et des traitements (Tr), d'après le critère %FE mesuré sur 20 clones en réponse à 25 traitements (cf Tab 3-23).

Classification ascendantes hiérarchiques réalisées d'après la distance euclidienne (dissimilarité), la méthode d'agrégation « ward » et la troncature automatique sur le logiciel R.

Classification des 20 clones d'après leur profil de réponse aux 25 traitements

- Le cluster CL1 contient les trois clones FDR5788, RRIM926 et FDR4575 qui apparaissent sensibles à tous les traitements (à l'exception des traitements à blanc) et en particulier aux traitements des clusters Tr1 et Tr2.
- Le cluster CL2 contient les 6 clones peu sensibles IRCA18, IRCA145, RRIM600, FDR5665, IRCA41 et FDR5240. Malgré tout, les clones IRCA18 et IRCA145 montrent une forte sensibilité aux 3 traitements du cluster Tr1. En particulier, les clones IRCA18 et IRCA145 ont des réponses très contrastées puisqu'ils sont très sensibles aux traitements du cluster Tr1 et peu ou pas sensibles aux traitements des clusters Tr2 et Tr3.
- Le cluster CL3 contient les 11 clones MDX624, CD1174, IRCA303, GT1, MDX607, RRIC100, PB217, PB254, RRIM901, IRCA19 et PB260 qui apparaissent très sensibles aux traitements des clusters Tr1 et Tr2 mais peu sensibles aux traitements du cluster Tr3. : MDX624, CD1174, IRCA303, GT1, MDX607, RRIC100, PB217, PB254, RRIM901, IRCA19 et PB260. On notera l'exception des clones PB217 et PB254 qui ne sont pas sensibles aux filtrats CCI403, CCI434 et CCP* (du cluster Tr2).

Les classifications ascendantes hiérarchiques ont permis de produire une représentation synthétique des profils de sensibilité des clones et des profils d'agressivité des traitements. Il convient cependant de souligner que les clusters ainsi formés reposent sur des différences quantitatives multifactorielles qui ne constituent pas de véritables frontières.

Pour cette expérience CI, on a réalisé une analyse de variance du critère %FE selon le même modèle statistique que celui utilisé dans l'expérience CF. Après avoir estimé les valeurs des combinaisons, on a vérifié la validité de l'analyse en examinant la distribution des résidus (Fig 3.18). Celle-ci est très proche d'une distribution normale.

Le Tab 3-24 a montré là aussi la significativité des effets « clone », « traitement » et « interaction clone x traitement ». Ces effets représentent au total 70 % de la variation des données expliquée par le modèle statistique, avec des contributions respectives de 20, 27 et 23 %.

Le Tab 3-25 présente les écarts d'interaction significativement différents de zéro. Parmi les 480 combinaisons clone x traitement testées, 78 combinaisons, soit une minorité, ont

présenté une interaction significative, dont 28 négatives (effet global inférieur à la somme des effets principaux) et 50 positives (effet global supérieur à la somme des effets principaux). On observe plus fréquemment des interactions significatives avec les traitements agressifs et les clones sensibles qui génèrent une plus grande variabilité de la réponse %FE parmi les combinaisons auxquelles ils participent. Concernant les trois traitements CCP, Tox5 et Tox10 qui ont en principe des effets similaires, on constate une assez faible répétabilité des effets d'interactions pour les clones concernés. Ainsi, pour les trois traitements, on observe une interaction positive pour IRCA145 et PB254, et une interaction négative pour GT1. Pour seulement deux des trois traitements, on observe une interaction positive pour IRCA18 et PB260, et une interaction négative pour FDR5240 et CD1174.

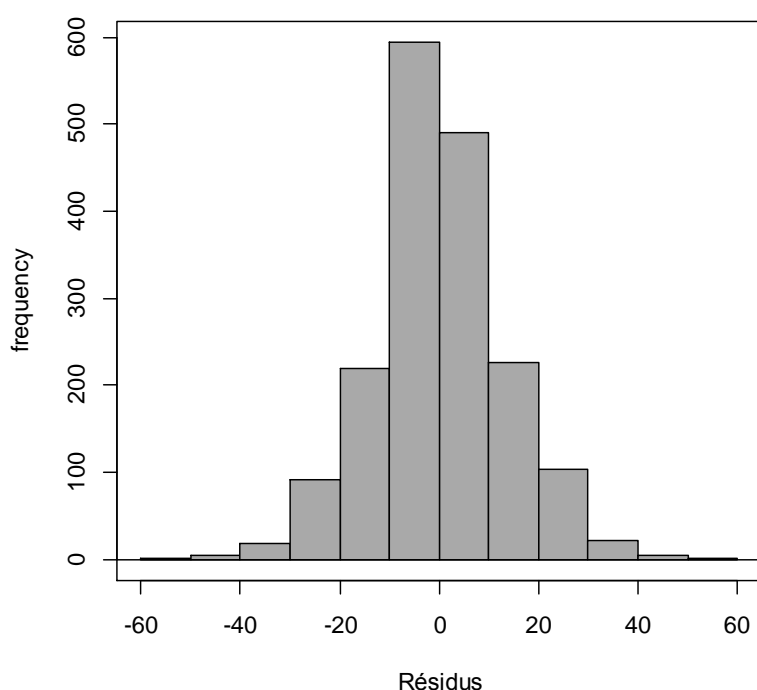


Fig 3.18: Expérience CI. Distribution des résidus. Analyse de variance du critère %FE.

Tableau 3-24. Expérience CI. Analyse de variance du critère %FE mesuré sur 20 clones en réponse à 25 traitements (cf Tab 3-23)

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Clone	19	203260	10697.9	43.8	< 2.2e-16***	20
Traitement	24	273058	11377.4	46.6	< 2.2e-16***	27
Clone x Traitement	436	235278	539.6	2.2	< 2.2e-16***	23
Résidus	1294	315985	244.2			30

dl : Degrés de liberté ; SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens ; Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité de F > de Fcritique: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport SCE sur SCE totaux

Tableau 3-25. Expérience CI. Effets principaux (clone et traitement) et effet interactif en %FE de 20 clones et 25 motifs (cf Tab 3-23).

Calcul des prédicteurs Blup (Best Linear Unbiased Predictor). Seuls les écarts d'interaction significatifs sont présentés. Le gradient de couleurs indique l'importance de l'effet interactif, du vert (négatif) au rouge (positif). 'NA' : donnée non disponible.

Type	Eau	Milieu culture	B4/Cas5	A4/Cas1	B4/Cas0	CF/Cas4	A4/Cas2	F1/Cas0	Cas I (1ng/μL)	A4/Cas0	B4/Cas5	B4/Cas5	A4/Cas0	A4/Cas0	A4/Cas0	C/Cas0	C/Cas1	C/Cas1	C/Cas1	C/Cas1	C/Cas1	Cas I (5ng/μL)	A4/Cas0	A4/Cas0	A4/Cas0	Cas I (10ng/μL)	Effet/ clone
Clone	Trait.	Tox0	Cz	CCI416	CCI405	CCI449	CCI423	CCI402	CTHA3	Tox1	CLN16	TSB1	CSB16	CCI403	CCI434	CIND3	CCP*	CNIG404	CCI501	CCAM3	CCP	Tox5	CSR15	CCI13	CCI6	Tox10	
IRCA18	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	NA	NA	-	NA	NA	NA	-	-	9	-	-	-11	10	-18	
IRCA41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	-	-13	-	-17
IRCA145	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	NA	NA	-	NA	NA	NA	-	9	15	-	-13	-13	10	-12	
FDR5240	-	-	-	10	11	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	-	-	-10	-	-12	-12	
RRIM600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	-12
FDR5665	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-13	-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-8
MDX624	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-4
MDX607	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-10	-	-	-	-	-	-	9	10	-2
CD1174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	-	-	-13	11	13	11	-10	-2
PB217	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	-	-	-	-	-	-	14	8	-	-	-	-1
GT1	-	12	9	9	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-12	-9	-	-	-14	-14	-1
RRIC100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	2
IRCA303	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	18	-	-	-10	-	-	-	-	3
PB254	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	11	-12	-	-	-	-11	-	-	-	16	17	-	-	-	11	3
RRIM901	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	-	-	-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	12	12	-	5
IRCA19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	16	10	-	-	-	-	-	-	11	7
PB260	-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	9	-	-	-	13	9
FDR5788	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	12	-	-	-	11	9	-	-	-	9	-	15
RRIM926	-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	10	-	-	21
FDR4575	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-10	9	9	-	-	24
Effet/ trait.	-18	-15	-14	-13	-12	-11	-11	-8	-6	-6	-5	-3	-3	0	0	2	8	10	10	10	11	12	14	15	20	24	

3.2.3.3 Analyse globale des deux expériences CF et CI

Une analyse globale des deux expériences, selon le critère %FE, prenant les expériences comme effet fixe et les autres effets comme aléatoires, a permis d'estimer les effets principaux de 22 clones et 31 traitements, et d'identifier les interactions significatives parmi les 622 combinaisons clone x traitement étudiées. On a écarté de cette analyse globale les 6 clones FDR5802, IRCA331, CDC56, IRCA230, CDC312 et PMB1 pour lesquels on disposait de moins de 50 mesures. On disposait pour cette analyse d'un nombre total de 2864 mesures, avec une variation de 53 à 216 mesures par clone selon les clones, et de 54 à 218 mesures par traitement selon les traitements. On a vérifié la validité de l'analyse en constatant que la distribution des résidus était proche d'une distribution normale (Fig 3.19).

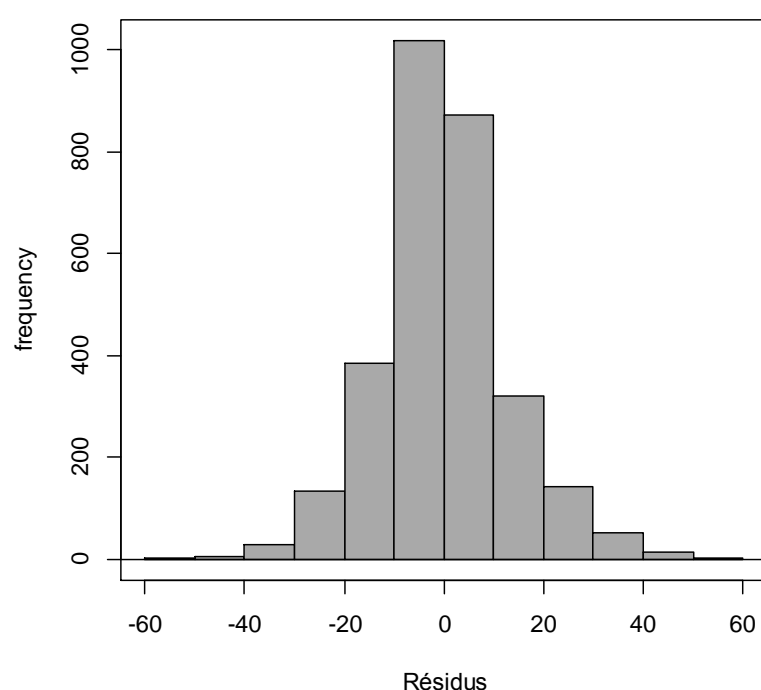


Fig 3.19: Analyse globale des expériences CF et CI. Distribution des résidus.

Tableau 3-26. Expérience CF et CI regroupées. Analyse de variance du critère %FE mesuré sur 22 clones en réponse à 18 traitements.

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Expérience	1	213653	213653	868,0	< 2.2e-16***	16
Clone	21	185230	8820	35,8	< 2.2e-16***	14
Traitement	17	256383	15081	61,3	< 2.2e-16***	20
Clone x Traitement	333	253050	760	3,1	< 2.2e-16***	20
Résidus	1606	395302	246			30

dl : Degrés de liberté ; SCE : Sommes des Carrés des Ecartés

CM : Carrés Moyens

Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité de F > de Fcritique: '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport SCE sur SCE totaux

Tableau 3-27. Expériences CF et CI regroupées. Présentation des 56 effets d'interaction significatifs.

Tableau classé dans l'ordre des effets principaux pour les clones et les traitements.

Type	Eau	Milieu culture	A/Cas2+6	A/Cas2	B4/Cas5	Cas1 (1ng/μL)	F1/Cas0	A4/Cas0	C/Cas0	A4/Cas0	C/Cas1	Cas1 (5ng/μL)	C/Cas1	C/Cas1	C/Cas1	A4/Cas0	Cas1 (10ng/μL)	A4/Cas0	Effet/clone
Clone	T0x0	Cz	RUD	IA	CSB1	T0x1	CTHA3	CIND3	CCP*	CSRI5	CNIG404	T0x5	CCAM3	CCI501	CCP	CCI13	T0x10	CCI6	
IRCA41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-15	-13
RRIM600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-13	-	-10
FDR5240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-14	-	-13	-	-10
FDR5665	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-13	-	-	-	-	-	-	-	-9
IRCA145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-15	-	-15	-9
IRCA18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	13	-14	-	-17	-6
MDX624	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11	-	-	17	-5
CD1174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-13	-	-	-12	14	-12	-	-3
PB217	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	14	-	13	-	-2
GT1	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-9	-	-	-14	-	-17	-14	-1
PB254	-	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-	22	-	-	12	-	20	-	1
IRCA303	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	13	-	-	19	-	-	-	-	2
IRCA19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	14	-	4
IRCA631	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	14	-	-	22	-	14	-	6
RRIM901	-	-	-	-	-	-10	-	-	-	15	-	-	-	-	-	11	-	-	7
PB260	-10	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	12	-	7
FDR5788	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	14	-	-	-	-	-	11
RRIM926	-12	-	-	-12	-	-	-	12	-	10	-	-	-	-	-	14	-	-	13
FDR4575	-	-	-13	-	-12	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	19
Effet/traitement	-14	-13	-9	-5	-5	-3	-2	2	4	9	10	11	11	12	13	16	20	20	

L'analyse de variance a montré des effets significatifs pour les facteurs « expérience », « clone », « traitement » et « interaction clone x traitement ». Le modèle statistique expliquait 63 % de la variation totale avec des contributions de 16 %, 14 %, 20 % et 20 % pour les quatre facteurs respectivement d'après les valeurs des sommes des carrés des écarts (Tab 3-26).

Parmi les 622 combinaisons étudiées, on en a trouvé seulement 56 présentant un effet d'interaction significatif concernant 19 clones et 18 traitements toxiques (Tab 3-27). Ces 56 combinaisons concernent principalement les clones sensibles et les traitements agressifs, dont les effets principaux importants génèrent des valeurs %FE élevées. On observe cependant un cas d'interaction positive pour une combinaison impliquant le traitement à blanc Cz (avec le clone GT1), et deux interactions négatives impliquant le traitement à blanc Tox0 (avec les clones PB260 et RRIM926). Concernant les trois traitements CCP, Tox5 et Tox10 dont les effets sont en principe similaires, on a observé trois interactions négatives pour les clones CD1174 et GT1, et trois interactions positives pour les clones PB217, PB254 et IRCA631.

3.2.4 Bilan des résultats de la section 3.2

Le phénotypage d'une gamme de clones d'hévéa au moyen du test toxique sur feuilles détachées, visant à évaluer leur sensibilité aux exsudats de *Corynespora* (toxine Cas1 purifiée et filtrats de différentes souches), a apporté les résultats suivants :

- La méthode d'évaluation des symptômes consistant à mesurer le pourcentage de fuite d'électrolytes (%FE) est plus sensible que la mesure visuelle de la surface de nécrose (SN)
- En comparant les résultats de deux expériences CF et CI, nous avons observé une assez bonne répétabilité des effets principaux de sensibilité des clones et d'agressivité des traitements. La répétabilité paraît cependant plus faible concernant les effets globaux et les effets d'interaction des combinaisons clone x traitement pour lesquelles on ne dispose généralement que de trois mesures par combinaison.
- Le critère %FE mesuré lors des tests toxiques a montré une variabilité importante et assez bien distribuée entre valeurs faibles et élevées, permettant ainsi de bien différencier les sensibilités des clones et les agressivités des traitements toxiques.

Son utilisation dans les deux expériences CF et CI a permis de caractériser les effets principaux de 22 clones et 31 traitements. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour mieux apprécier la répétabilité des effets d'interaction observés.

Dans la partie suivante, nous présenterons l'utilisation de la méthode du test toxique et du critère %FE pour phénotyper la descendance F1 de la population biparentale PB260 x RRIM600 afin d'étudier le déterminisme génétique de la réponse au test par détection de QTL.

3.3 Cartographie génétique et détection de QTL associés aux exsudats de *Corynespora* et à des notations d'attaque de maladie en champ

Deux populations distinctes de la famille PB260 x RRIM600 sont étudiées en champ à la SOGB (Pop1) et à Toupah (Pop2) en vue d'une sélection précoce. Ces populations ont servi de matériel d'étude pour une recherche de QTL associés à la réponse aux tests toxiques (critère %FE) et à des notations d'attaque de maladies de feuilles en champ.

3.3.1 Cartographie génétique de la famille PB260 x RRIM600

Les travaux de génotypage par marqueurs microsatellites des individus des populations Pop1 et Pop2 ont été effectués au cours des stages de Master de TRAN Dinh Minh (auteur de la présente thèse) en 2013 pour la population Pop1, et d'Achour Zeineb en 2014 pour la population Pop2. Dans le cadre de cette thèse, nous avons réalisé une nouvelle carte génétique synthétique à partir des données cumulées de génotypage des deux populations.

A l'aide de huit marqueurs SSR (Tab 2-5), nous avons tout d'abord vérifié la légitimité des 441 génotypes de la famille PB260 x RRIM600 qui avaient été multipliés végétativement et mis en essais en champ sur les plantations de la SOGB (Pop1, 265 génotypes) et de la SAPH (Pop2, 176 génotypes). Nous avons détecté 18 individus illégitimes dans Pop1 (6.8 %) et 19 dans Pop2 (10.8 %). Parmi les descendants légitimes, on a retenu aléatoirement 191 génotypes (individus) à la SOGB (Pop1) et 152 à Toupah (Pop2) pour le génotypage.

Tableau 3-28. Cartographie génétique des deux populations issues de la famille PB260 x RRIM600 et phénotypées en champ sur les sites de SOGB (Pop1) et Toupah (Pop2).

Répartition des effectifs des marqueurs SSR par type de ségrégation et par site. Longueurs totales des cartes et longueurs moyennes par intervalle (cM). Codifications des ségrégations selon les règles du logiciel JoinMap 4.1, algorithme de régression, distance de Kosambi (Van Ooijen, 2006).

Type de segregation	Génotypes des descendants	Ratio de ségrégation	Nombre de marqueurs SSRs ségrévés		
			Pop1 (SOGB) (191 génotypes)	Pop2 (Toupah) (152 génotypes)	Pop1 + Pop2 (343 génotypes)
<abxcd>	ac, ad, bc, bd	1 : 1 : 1 : 1	38	33	39
<efxeg>	ee, eg, ef, eg	1 : 1 : 1 : 1	81	76	86
<hxxhk>	hh, hk, kk	1 : 2 : 1	36	30	35
<lmxll>	lm, ll	1 : 1	94	84	92
<nnxnp>	nn, np	1 : 1	57	51	56
Marqueurs totaux			306	274	308
Nombre de groupes de liaison			18	18	18
Longueurs totales (cM)			2005	2021	2036
Longueurs moyennes par intervalle (cM)			6.6	7.4	6.6

Un nombre de 392 marqueurs SSR avait été sélectionné à la suite d'une étude de polymorphisme des marqueurs sur l'un ou l'autre des deux parents PB260 et RRIM600. Ces 392 marqueurs ont été utilisés pour le génotypage des 343 individus. Les effectifs des marqueurs pour chaque site et pour les deux sites combinés sont présentés par type de ségrégation dans le Tab 3-28. On a pu cartographier 306 marqueurs à partir de la population Pop1, 274 marqueurs à partir de la population Pop2, et 308 marqueurs en cumulant les deux populations. On dispose ainsi de 3 cartes génétiques synthétiques (combinant les données de ségrégation des deux parents de la famille) issues de Pop1, Pop2 et Pop1 + Pop2. Ces trois cartes comportent les 18 groupes de liaison attendus, correspondant aux 18 chromosomes du génome haploïde de l'hévéa. La longueur totale de chaque carte varie de 2005 à 2036 cM, avec un intervalle moyen entre les marqueurs consécutifs variant de 6.6 à 7.4 cM (Tab 3-28).

Les caractéristiques de chaque groupe de liaison sont présentées dans le Tab 3-29:

- Pour la population Pop1, la carte comporte 306 *locus* pour une longueur totale de 2004 cM, avec un intervalle moyen de 6.6 cM entre deux *locus* adjacents. Pour les 18 groupes de liaison, la longueur varie de 70.9 (groupe g12) à 147.3 cM (en g8) et l'intervalle moyen entre les *locus* varie de 4.6 (groupe g10) à 10.3 cM (en g11).

- Pour la population Pop2, la carte comporte 274 *locus* pour une longueur totale de 2021 cM, avec un intervalle moyen de 7.4 cM. Pour les 18 groupes de liaison, la longueur varie de 63.0 (groupe g12) à 158.8 cM (groupe g8) et l'intervalle entre les *locus* varie de 5.7 (groupe g2) à 13.0 cM (groupe g11).
- Pour les populations Pop1 + Pop2 cumulées, la carte synthétique comporte 308 marqueurs SSR et présente une longueur totale de 2036 cM, avec un intervalle moyen de 6.6 cM. Pour les 18 groupes de liaison obtenus, la longueur varie de 69.4 (groupe g12) à 147.3 cM (groupe g8), et l'intervalle varie de 4.8 (groupe g10) à 11.0 cM (groupe g16). Cette carte présente 16 grands intervalles sans marqueur dont les longueurs varient entre 20.5 et 41.7 cM et représentent une distance cumulée de 466 cM (23 % de la longueur totale de la carte).

Tableau 3-29. Caractérisation des cartes obtenues pour chaque population (Pop1 et Pop2) et pour la combinaison des deux populations.

Longueurs totales (cM), nombre de marqueurs et longueur moyenne par intervalle (cM) pour chaque groupe de liaison.

Groupes de liaison	Pop1, (SOGB)			Pop2, (Toupah)			Pop1 + Pop2		
	Longueur (cM)	Nbre de <i>locus</i>	Intervalle (cM)	Longueur (cM)	Nbre de <i>locus</i>	Intervalle (cM)	Longueur (cM)	Nbre de <i>locus</i>	Intervalle (cM)
g1	98.8	15	6.6	102	15	6.8	101.2	16	6.3
g2	116.8	21	5.6	114	20	5.7	114.8	21	5.5
g3	114.7	15	7.6	108.6	15	7.2	113.7	15	7.6
g4	94.9	12	7.9	83.5	10	8.4	92.8	12	7.7
g5	107.2	20	5.4	92.3	16	5.8	102.4	21	4.9
g6	108	14	7.7	114.4	14	8.2	112.3	14	8
g7	105.6	17	6.2	119.7	15	8	114.8	18	6.4
g8	147.3	22	6.7	158.8	19	8.4	147.3	22	6.7
g9	112.6	21	5.4	122.4	19	6.4	114.2	21	5.4
g10	132.4	29	4.6	150.4	25	6	143.7	30	4.8
g11	133.7	13	10.3	130.2	10	13	143.6	13	11
g12	70.9	10	7.1	63	10	6.3	69.4	10	6.9
g13	127.4	15	8.5	127.9	13	9.8	130	15	8.7
g14	103.8	18	5.8	104.9	17	6.2	104.4	18	5.8
g15	120.1	22	5.5	144.9	17	8.5	124.6	21	5.9
g16	131.6	13	10.1	96.4	12	8	129.5	13	10
g17	92.5	15	6.2	95.6	13	7.4	95.2	15	6.3
g18	87	14	6.2	91.6	14	6.5	81.8	13	6.3
Total	2005	306		2021	274		2036	308	
Intervalle moyen			6.6			7.4			6.6

On a observé une très bonne stabilité de l'ordre des marqueurs communs pour les 18 groupes de liaison sur les trois cartes. La colinéarité des marqueurs entre les trois cartes est illustrée sur la Fig 3.20, avec l'exemple du groupe de liaison g2, et en Annexe 4 pour tous les groupes de liaison. Cependant, la carte génétique obtenue avec 343 individus par le cumul des deux populations Pop1 et Pop2 est en principe plus précise, notamment pour ce qui concerne les distances entre marqueurs. Donc pour la suite de cette étude, nous avons utilisé la carte synthétique (Fig 3.21) pour réaliser la détection de QTL.

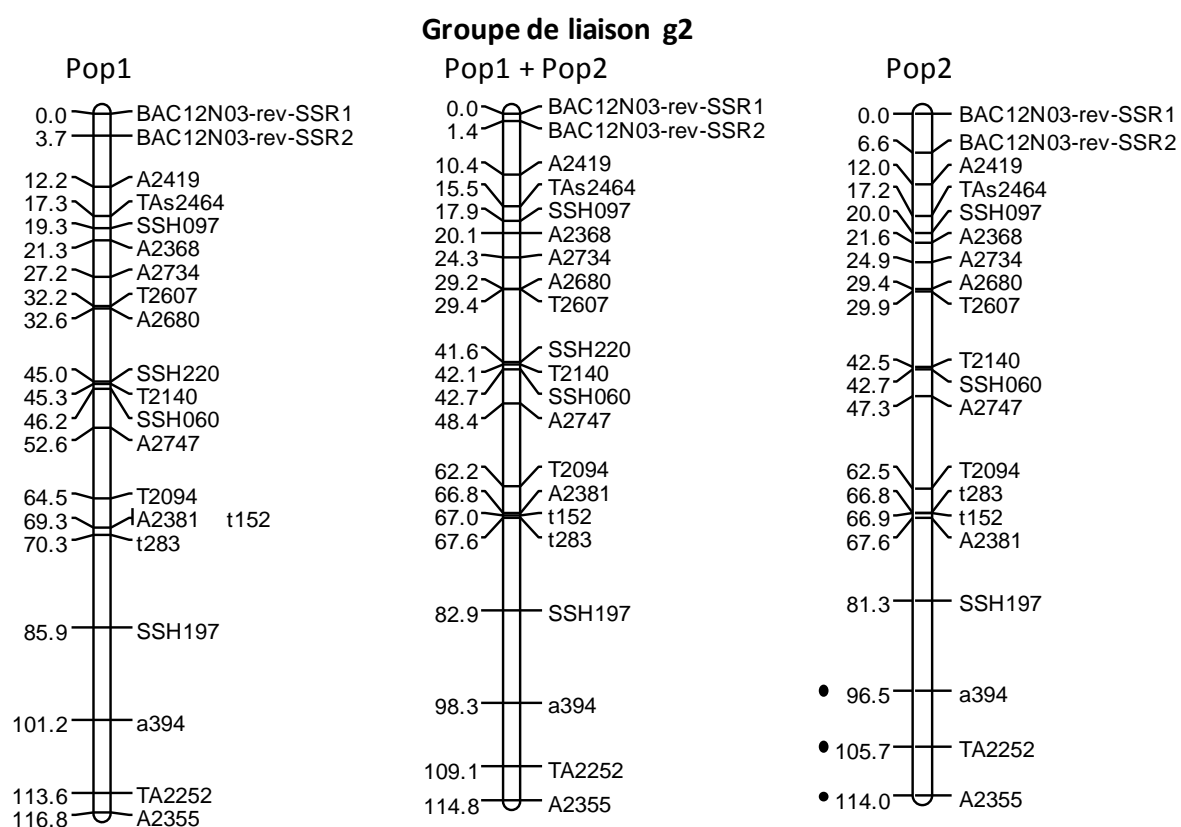


Fig 3.20: Cartographie génétique des deux populations Pop1 et Pop2, et de la combinaison des deux populations.

Groupe de liaison g2. Présentation comparée de l'ordre des marqueurs sur les trois cartes synthétiques (Pop1, Pop2, et Pop1 + Pop2). JoinMap 4.1, algorithme de cartographie par régression linéaire, distance de Kosambi.

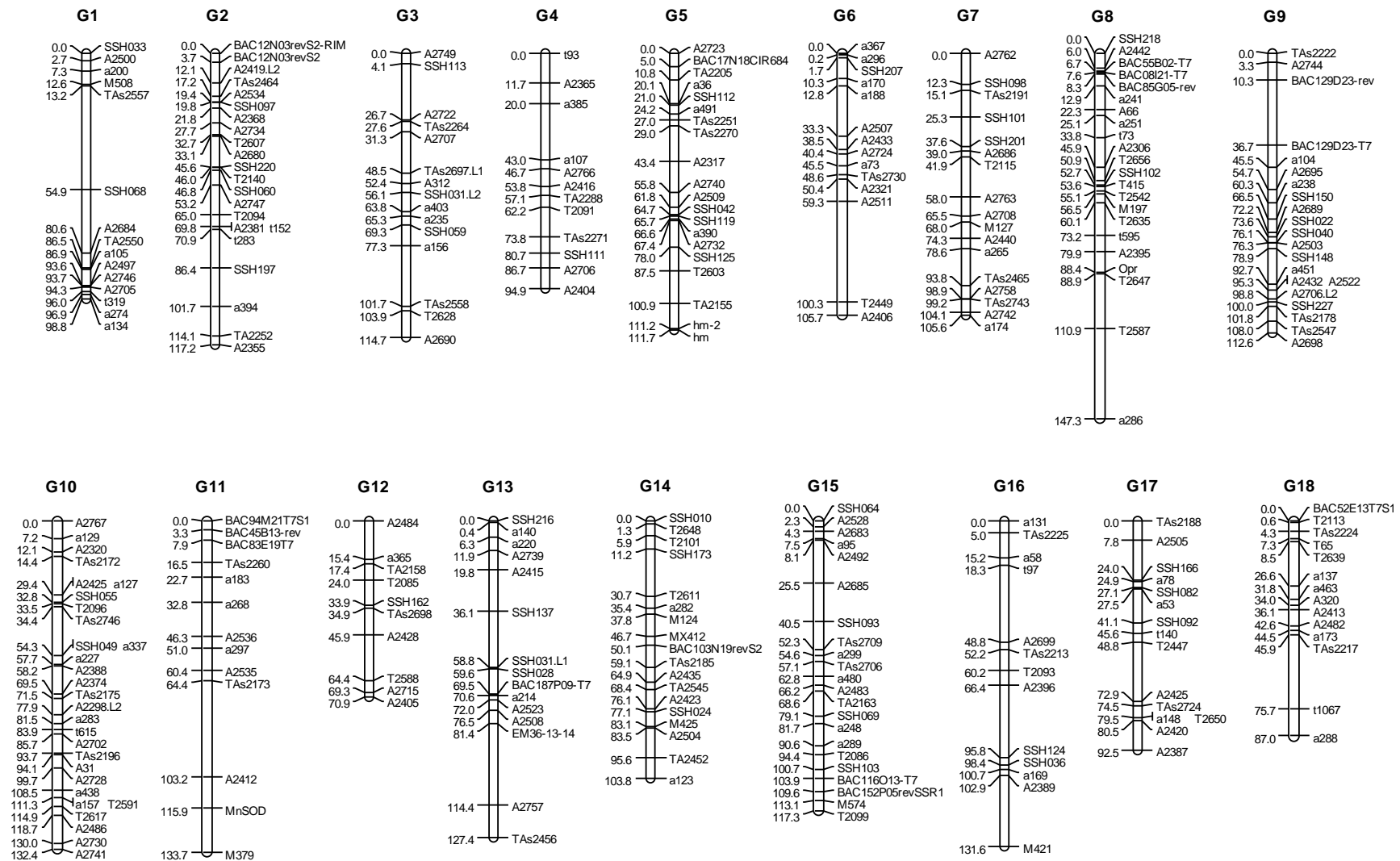


Fig 3.21: Carte génétique synthétique établie à partir de Pop1 + Pop2 de la famille PB260 x RRIM600 (343 génotypes, 308 marqueurs SSR). Logiciel JoinMap 4.1, algorithme de cartographie par régression linéaire, distance de Kosambi.

Tableau 3-30. Héritabilité du critère %FE sur les deux populations Pop1 à la SOGB et Pop2 à Toupah (famille PB260 x RRIM600).

Présentation des 19 traitements toxiques appliqués (deux traitements à blanc inclus). Nombre de génotypes phénotypés (N) et héritabilité au sens large (h^2) de %FE. Les traitements incluent les filtrats de la souche CCP et de la souche CCP mutée (délétion du gène *CasI*), une solution de toxine purifiée Cas1 à la concentration de 5 ng/ μ L provenant de la souche CCP, 14 autres filtrats de différentes souches et deux traitements à blanc (Cz et Tox0). La notation de l'état de maladie a été réalisée sur Pop1 en novembre 2014 et sur Pop2 en septembre 2015.

Traitement	Origine géographique	Type de souche	Essai	N	h^2
Tox5 Cas 1 (5 ng/ μ L)	Philippines	C/Cas1	Pop1 Pop2	189 152	0.78 0.70
CCP	Philippines	C/Cas1	Pop1 Pop2	189 152	0.78 0.73
CCP mutée	Mutante	C/Cas0	Pop2	152	0.32
CCI501	Côte d'Ivoire	C/Cas1	Pop2	152	0.71
CNIG404	Nigéria	C/Cas1	Pop2	152	0.72
CCAM3	Cameroun	C/Cas1	Pop1	189	0.58
CCI405	Côte d'Ivoire	A4/Cas1	Pop2	152	0.32
CCI403	Côte d'Ivoire	A4/Cas0	Pop2	152	0.30
CIND3	Inde	A4/Cas0	Pop2	152	0.59
CLN16	Malaisie	A4/Cas0	Pop2	152	0.47
CCI434	Côte d'Ivoire	A4/Cas0	Pop2	152	0.22
CCI13	Côte d'Ivoire	A4/Cas0	Pop1	189	0.44
CCI6	Côte d'Ivoire	A4/Cas0	Pop1	189	0.49
CSRI5	Sri-lanka	A4/Cas0	Pop1	189	0.55
CSB16	Malaisie	B4/Cas5	Pop1	189	0.79
TSB1	Malaisie	B4/Cas5	Pop1	189	0.51
CTHA3	Thaïlande	F1/Cas0	Pop2	152	0.37
Tox0			Pop1	189	0.01
Eau			Pop2	152	0.18
Cz			Pop1	189	0.18
Milieu de culture			Pop2	152	0.19
Notation de l'état de maladie observée en champ		Nov 2014	Pop1	189	0.59
		Sept 2015	Pop2	152	0.77

3.3.2 Phénotypage de la famille PB260 x RRIM600

3.3.2.1 Méthodes de phénotypage, traitements toxiques

Deux méthodes de phénotypage ont été appliquées : d'une part le test toxique sur feuilles détachées et d'autre part la notation visuelle de l'intensité des attaques de maladie en champ dans les essais de la SOGB et de Toupah.

Phénotypage par le test toxique :

Le critère %FE a été mesuré. La mesure des surfaces de nécroses induites par les traitements toxiques a été abandonnée, du fait de sa moindre variabilité et du fait qu'elle semblait

assez spécifique de certains traitements toxiques (filtrats de souche CCP et toxine purifiée Cas1 issue de cette souche) (voir section §3.2).

Les traitements toxiques choisis pour le phénotypage sont présentés dans le Tab 3-30. Ils montrent une assez bonne diversité selon leur type (groupe génétique/classe toxique) et selon leur agressivité sur les deux clones parentaux de la famille PB260 x RRIM600 (voir section §3.2). Les isolats portant le gène *Cas1*, tels que CCP et CCAM3, de type C/Cas1, ont montré une forte agressivité. Les deux isolats CCI501, CNIG404, sont du même type C/Cas1. Les isolats CIND3, CLN16 et CSRI5 (type A4/Cas0) ainsi que CTHA3 (type F1/Cas0), bien que dépourvus du gène *Cas1* codant pour la cassiicoline, sont pourtant très agressifs. On a choisi également deux isolats moyennement agressifs provenant de Malaisie, CSB16 et TSB1 (type B4/Cas5) et deux isolats très agressifs provenant de Côte d'Ivoire, CCI6 et CCI13 (type A4/Cas0) (Valérie Pujade-Renaud, communication personnelle). Parmi les cinq isolats de Côte d'Ivoire (CCI) qui ont été isolés et caractérisés pour leur groupe génétique et leur classe toxique au cours de la thèse, CCI403 et CCI434 (type A4/Cas0) sont apparus moyennement agressifs sur une gamme diversifiée de clones (section §3.2). L'isolat CCI405 possède le gène *Cas1* codant pour la cassiicoline et il appartient au groupe génétique A4 (type A4/Cas1). Enfin, on a retenu un filtrat de la souche CCP mutée en laboratoire pour supprimer le gène de cassiicoline *Cas1* (Déon et al., non publié). Cette souche nommée CCP*, est donc de type C/Cas0.

Les souches utilisées diffèrent également par leurs origines géographiques : Inde (CIND3), Malaisie (CLN16, CSB16 et TSB1), Nigéria (CNIG404), Sri-Lanka (CSRI5), Thaïlande (CTHA3), Cameroun (CCAM3), et Côte d'Ivoire (CCI403, CCI434, CCI13, CCI6, CCI405 et CCI501).

L'étude de la réponse d'une gamme diversifiée de clones aux tests toxiques (voir section §3.2), a montré une grande variabilité de réponse des clones parentaux PB260 et RRIM600 à ces traitements. L'agressivité d'une solution toxique Cas1 à 5 ng/μL (Tox5) et celle du filtrat de la souche CCP étaient similaires sur les clones étudiés. Tous les traitements étaient très agressifs sur le clone PB260, à l'exception des filtrats CLN16, TSB1, CCI403 et CCI405 qui étaient peu agressifs. En revanche, ces traitements étaient peu agressifs sur le clone RRIM600 sauf les filtrats des trois souches africaines CCI6, CCI13 et CCAM3 qui étaient moyennement agressifs. Les sensibilités différentes des deux clones parentaux (PB260 sensible, RRIM600 tolérant) permettaient d'attendre en principe une ségrégation importante dans la descendance pour la réponse aux tests toxiques envisagés.

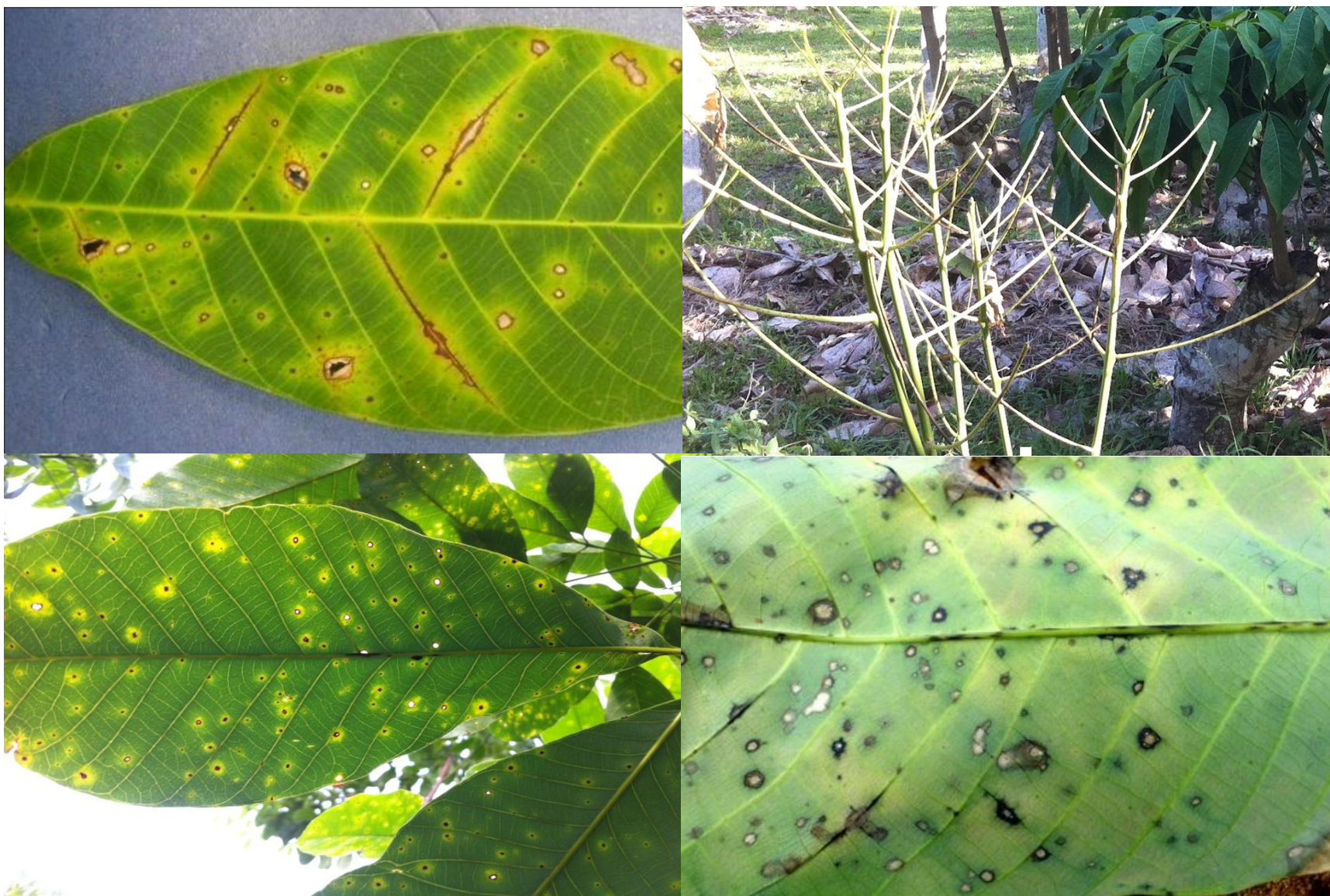


Fig 3.22: Symptômes foliaires d'attaques de *Corynespora* observés en champ en Côte d'Ivoire.

Les descendants de la famille PB260 x RRIM600 ont été phénotypés au moyen du test toxinique (%FE) pour évaluer leurs réponses à 19 traitements toxiques (deux blancs Cz et Tox0 inclus), répartis sur deux sites de Côte d'Ivoire. Sur le site 1 (SOGB), les 189 génotypes ont reçu les huit traitements Tox5, CCP, CCAM3, CCI13, CCI6, CSRI5, CSB16 et TSB1. Sur le site 2 (Toupah), les 152 génotypes ont reçu les 11 traitements Tox5, CCP, CCP* (mutant), CCI501, CNIG404, CCI405, CCI403, CIND3, CLN16, CTHA3 et CCI434 (Tab 3-30). Pour chaque combinaison génotype x traitement, le test a été répété sur trois plants greffés différents.

Phénotypage par notation visuelle des symptômes foliaires dans les essais :

On a observé *in situ* des symptômes foliaires assez importants sur les individus des deux essais. Il était souvent difficile de différencier les symptômes attribués à *Colletotrichum gloeosporioides* ou *Corynespora cassicola*. Les symptômes en « arêtes de poisson » considérés comme typiques de *Corynespora* ont été observés peu fréquemment. On observait plus fréquemment des lésions circulaires brunes associées à une légère chlorose périphérique, peu différents des symptômes de l'anthracnose causés par *Colletotrichum*. On a donc été contraints de noter l'intensité des symptômes foliaires sans pouvoir différencier ces deux agresseurs fongiques (Fig 3.22). De plus, les symptômes variaient en fonction de la saison d'observation. Ainsi l'essai de Pop1 a pu être noté en novembre 2014. En revanche, l'essai Pop2 était sain en novembre 2014, mais assez fortement attaqué en septembre 2015, permettant alors des notations. Les symptômes variaient également selon les stades foliaires, avec une forte sensibilité des feuilles jeunes aux stades A, B, C et une faible sensibilité des feuilles matures au stade D).

Un système de notation de l'intensité d'attaque de 1 à 5 a été utilisé pour les feuilles jeunes (stade A, B et C) des nouveaux flushs foliaires sur chaque arbre, afin de disposer de données semi-quantitatives utilisables pour la détection de QTL:

- Note 1 : les jeunes feuilles sont saines, avec peu de symptômes sur les feuilles matures ; la couronne de feuilles est dense. Certains individus ont ramifié tard et en hauteur, tandis que d'autres individus ont ramifié tôt à faible hauteur. On ne pouvait donc pas les comparer pour l'état de leurs couronnes
- Note 2 : environ 2/3 des jeunes feuilles sont malades mais sans défoliation ; on observe des traces de symptômes sur les feuilles matures, et les couronnes sont assez denses.

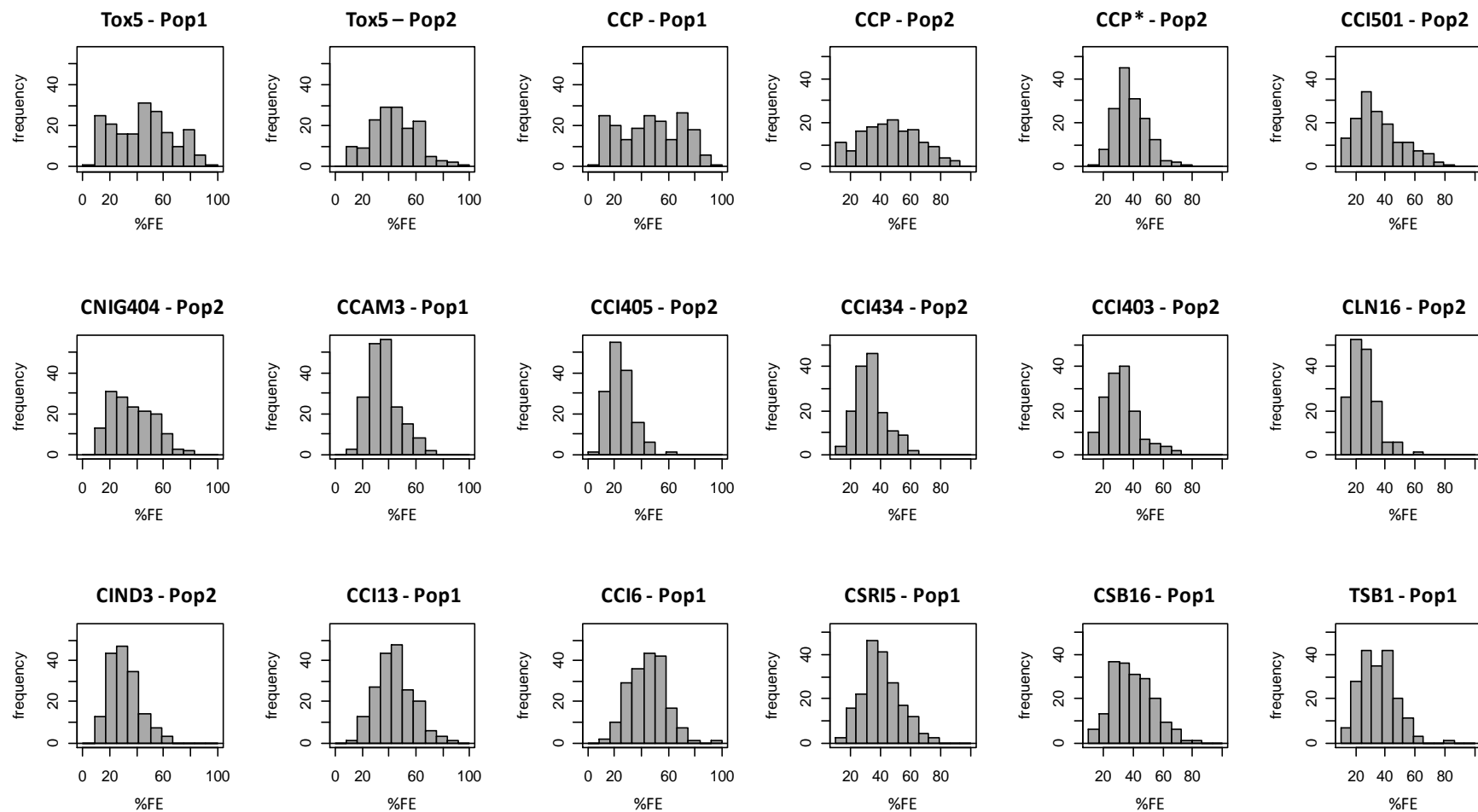


Fig 3.23: Histogrammes de distribution des valeurs moyennes %FE par individu (Pop1 et Pop2) pour 18 des différents traitements toxiques.

- Note 3 : toutes les jeunes feuilles sont malades, environ 1/3 des feuilles jeunes ou matures ont défolié.
- Note 4 : toutes les jeunes feuilles sont défoliées, ainsi que la moitié des feuilles matures.
- Note 5 : toutes les jeunes feuilles sont défoliées, ainsi qu'environ 2/3 des feuilles matures ; la couronne est peu dense.

3.3.2.2 Distribution des données

Les histogrammes de distribution des valeurs %FE moyennes mesurées sur les individus des populations Pop1 (SOGB) et Pop2 (Toupah) de la famille PB260 x RRIM600, pour 18 traitements indiqués dans le Tab 3-30 (hors traitements à blanc), sont présentés sur la Fig 3.23. Seule la distribution de %FE pour le traitement CTHA3 appliqué à Toupah n'est pas figurée. Globalement, ces histogrammes montrent l'existence d'une variabilité importante du critère %FE parmi les descendants, avec une distribution des valeurs proche de la normalité (test de Shapiro-Wilk au risque $\alpha = 0.05$), sauf pour les traitements Tox5-Pop1 et CCP-Pop1, pour lesquels les distributions sont très étalées.

Concernant les notations d'intensité d'attaque de maladie en champ, la distribution des notations de l'essai Pop1 à la SOGB ne suit pas une loi normale et présente des données étalées sur toute la gamme de notation. En revanche, la distribution des notations dans l'essai Pop2 à la SAPH-Pop2 est proche de la normalité, avec une moyenne relativement faible correspondant à une faible intensité d'attaque de la maladie (Fig 3.24).

3.3.2.3 Héritabilités des critères mesurés

Les héritabilités du critère %FE estimées pour les différents traitements et pour les notations d'intensité d'attaque en champ sont présentées dans le Tab 3-30. On a trouvé des héritabilités élevées pour Tox5, CCP, CCI501, CNIG404, et CSB16 ($h^2 > 0.70$). La variance génétique du critère %FE mesuré parmi la descendance en réponse à ces traitements est donc importante, ce qui augmente les chances de détecter des QTL. Pour les autres traitements, l'héritabilité varie de 0.22 à 0.59. Pour les traitements à blanc, l'héritabilité était logiquement faible ($h^2 < 0.20$).

L'héritabilité du critère de notation de l'intensité d'attaque en champ de la maladie fongique des feuilles était de $h^2 = 0.59$ pour la population Pop1 observée en novembre 2014, et de $h^2 = 0.77$ pour la population Pop2 observée en septembre 2015.

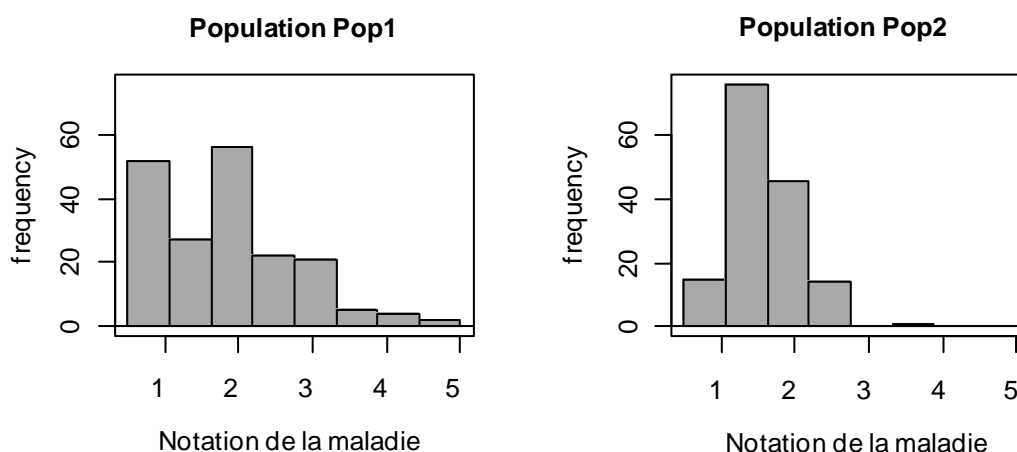


Fig 3.24: Histogrammes de distribution des notes d'intensité d'attaque des maladies foliaires observées en champ (en cinq notes).

Population Pop1 observé en Nov 2014, population Pop2 observée en Sep 2015.
Notations variant de 1 (arbre sain) à 5 (arbre très malade).

Tableau 3-31. Matrice des corrélations par paires entre les valeurs moyennes par individu pour les 10 exsudats et pour la notation d'attaque de maladie en champ de Pop1 faite en novembre 2014.

Phénotypage de la population cartographiée Pop1 (famille PB260 x RRIM600) étudiée à la SOGB (189 individus). En gras : coefficients significatifs au seuil $\alpha = 0.05$.

Variable	Tox5	CCP C/Cas1	CCAM3 C/Cas1	CCI6 A4/Cas0	CCI13 A4/Cas0	CSRI5 A4/Cas0	CSB16 B4/Cas5	TSB1 B4/Cas5	Cz	Tox0
CCP C/Cas1	0.86									
CCAM3 C/Cas1	0.15	0.23								
CCI6 A4/Cas0	0.2	0.27	0.71							
CCI13 A4/Cas0	0.2	0.26	0.73	0.82						
CSRI5 A4/Cas0	0.21	0.27	0.74	0.76	0.79					
CSB16 B4/Cas5	0.07	0.11	0.65	0.71	0.71	0.69				
TSB1 B4/Cas5	0.17	0.17	0.65	0.69	0.64	0.69	0.64			
Cz	0.15	0.14	-0.07	-0.11	-0.05	-0.11	-0.08	-0.07		
Tox0	0.14	0.13	0.02	-0.04	-0.01	0	-0.03	0.05	0.68	
Maladie en champ 11/2014	0.07	0.1	0.2	0.15	0.26	0.21	0.2	0.14	-0.02	0.04

3.3.2.4 Corrélations entre les traitements et classifications hiérarchiques

Les matrices de corrélation par paires entre les différents critères (%FE mesurés pour les différents traitements et pour la notation d'intensité d'attaque observée en champ), et les graphes de classifications ascendantes hiérarchiques réalisées sur les mêmes données sont présentés dans le Tab 3-31 et la Fig 3.25 pour la population Pop1 (SOGB), et dans le Tab 3-32 et la Fig 3.26 pour la population Pop2 (Toupah).

Pour les traitements testés à la SOGB (Pop1), la matrice de corrélation présentée dans le Tab 3-31 a montré les résultats suivants :

- Une corrélation positive forte entre la toxine purifiée Tox5 et le filtrat de la souche CCP (de type C/Cas1) dont cette toxine est issue ($r = 0.86$)
- Une corrélation positive forte, avec r variant entre 0.64 et 0.82, entre les filtrats de six souches (trois d'origine africaine CCAM3, CCI13, CCI6 et trois d'origine asiatique CSRI5, CSB16, TSB1), dont trois souches de type A4/Cas0 (CSRI5, CCI13 et CCI6), deux souches de type B4/Cas5 (CSB16 et TSB1) et une souche de type C/Cas1 dont on sait que le gène *CasI* est peu exprimé (CCAM3).
- Une corrélation positive forte entre les deux traitements à blanc Tox0 et Cz ($r = 0.68$)
- Une absence de corrélation entre ces trois groupes de traitements. Notamment, le critère de notation d'intensité d'attaque en champ n'est corrélé avec aucun traitement toxinique.

Ces résultats sont bien illustrés par le dendrogramme de classification hiérarchique des différents traitements toxiques pour les données %FE (Fig 3.25). La classification hiérarchique a en effet révélé l'existence de trois groupes de traitements distincts:

- Groupe 1 : les deux traitements à blanc (Cz et Tox0)
- Groupe 2 : toxine Cas1 purifiée à 5 ng/ μ L (Tox5) et filtrat de la souche CCP
- Groupe 3 : filtrats de culture des six souches CSRI5, CCI6, CCI13, CSB16, TSB1 et CCAM3.

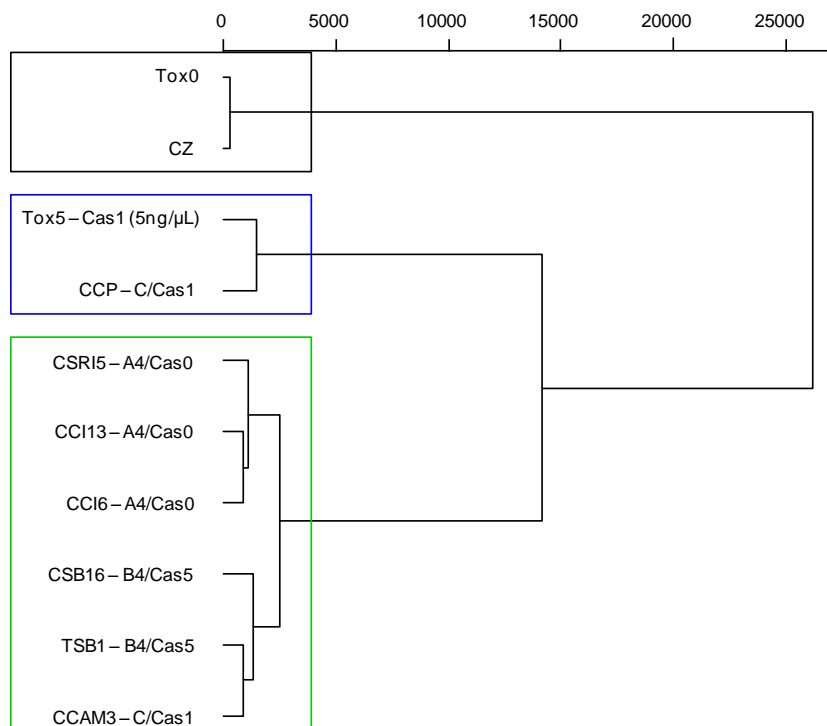


Fig 3.25: Classification ascendante hiérarchique des traitements toxiques appliqués sur la population cartographiée Pop1 (famille PB260 x RRIM600).

Essai Pop1 étudiée à la SOGB (189 individus) aux 10 traitements toxiques de *Corynespora*. Traitements à blanc inclus. Critère %FE.

Pour les traitements testés à Toupah (Pop2), la matrice de corrélation présentée dans le Tab 3-32 a montré :

- Une corrélation positive entre Tox5 et les filtrats de culture de trois souches de type C/Cas1 (CCP, CCI501 et CNIG404).
- Une corrélation positive entre les filtrats CCP* (souche CCP mutée pour la délétion du gène *CasI*), CCI405 (type A4/Cas1), CCI403 et CCI434 (type A4/Cas0).
- Une corrélation positive à la limite de signification entre CLN16 et CTHA3
- Une corrélation positive entre les deux traitements à blanc
- Aucune corrélation entre la notation d'intensité d'attaque en champ et les tests toxiques.

La classification hiérarchique des traitements effectués à Toupah sur 152 génotypes a révélé quatre groupes de traitements (Fig 3.26):

- Groupe 1 : les deux traitements à blanc Cz et Tox0
- Groupe 2 : les filtrats de culture CIND3, CTHA3 et CLN16.
- Groupe 3 : Tox5, CCP, CCI501 et CNIG404
- Groupe 4 : CCP*, CCI403, CCI405 et CCI434.

Tableau 3-32. Matrice des corrélations par paires entre les valeurs moyennes par individu pour les 13 exsudats et pour les notations d'attaque de maladie en champ de Pop2 faite en septembre 2015.

Phénotypage de la population cartographiée Pop2 (famille PB260 x RRIM600) étudiée à Toupah (152 individus). CCP* = filtrat de souche CCP mutée pour la délétion du gène Cas1.

En gras : coefficients significatifs au seuil $\alpha = 0.05$.

Variable	Tox5	CCP C/Cas1	CCI501 C/Cas1	CNIG404 C/Cas1	CCP* C/Cas0	CCI405 A4/Cas1	CCI403 A4/Cas0	CCI434 A4/Cas0	CIND3 A4/Cas0	CLN16 A4/Cas0	CTHA3 F1/Cas0	Cz	Tox0
CCP C/Cas1	0.76												
CCI501 C/Cas1	0.55	0.5											
CNIG404 C/Cas1	0.56	0.47	0.81										
CCP* C/Cas0	0.31	0.25	0.31	0.3									
CCI405 A4/Cas1	0.18	0.14	0.26	0.22	0.58								
CCI403 A4/Cas0	0.37	0.29	0.35	0.4	0.64	0.42							
CCI434 A4/Cas0	0.33	0.29	0.42	0.41	0.71	0.68	0.7						
CIND3 A4/Cas0	0.37	0.36	0.3	0.3	0.32	0.3	0.4	0.45					
CLN16 A4/Cas0	-0.08	0.01	0.12	0.06	0.08	0.09	0.01	0.08	0.09				
CTHA3 F1/Cas0	-0.1	-0.04	-0.1	-0.16	0.03	0.03	-0.07	-0.04	0.03	0.51			
Cz	0.14	0.14	0.13	0.09	0.09	0.08	0.19	0.15	0.19	-0.09	-0.03		
Tox0	0.13	0.12	0.11	0.03	0.19	0.09	0.16	0.19	0.17	-0.06	0.06	0.56	
Maladie en champ 9/2015	-0.17	-0.16	-0.07	-0.11	-0.11	-0.06	-0.2	-0.17	-0.15	0.09	0.11	0.07	-0.12

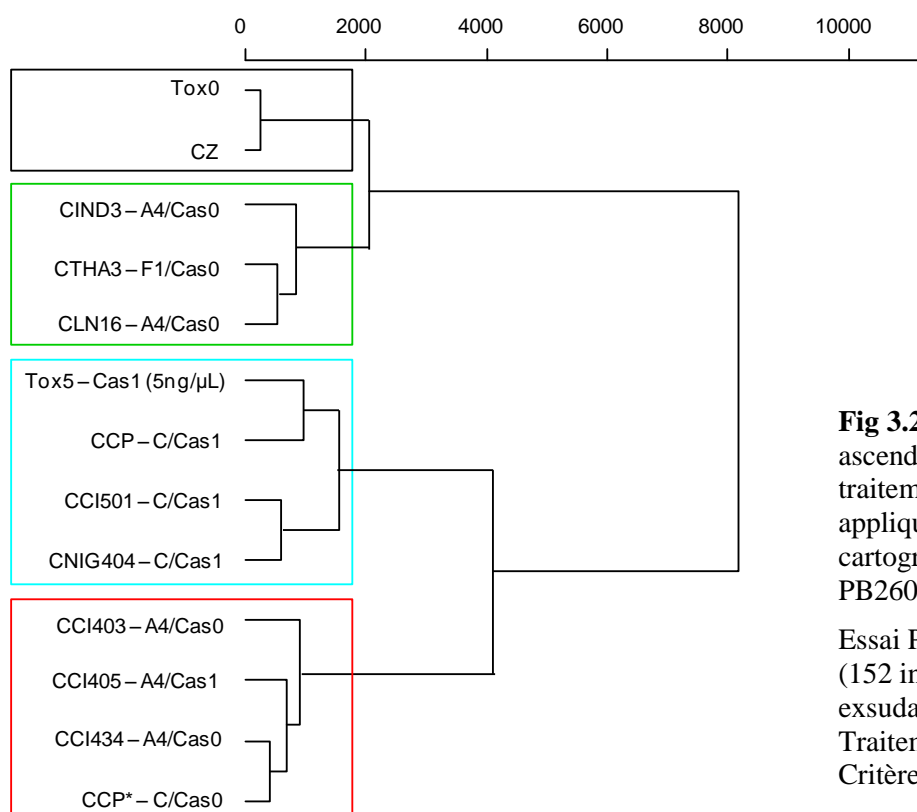


Fig 3.26: Classification ascendante hiérarchique des traitements toxiques appliqués sur la population cartographiée Pop2 (famille PB260 x RRIM600).

Essai Pop2 étudié à Toupah (152 individus) aux 13 exsudats de *Corynespora*. Traitements à blanc inclus. Critère %FE.

3.3.3 Déterminisme génétique des critères mesurés

3.3.3.1 Détection de QTL

Une recherche de QTL a été menée pour les réponses des populations Pop1 et Pop2 aux traitements toxiques (%FE) et pour la notation de l'état sanitaire des feuilles dans les deux essais. Aucun QTL n'a été détecté pour les traitements à blanc Cz et Tox0, ni pour les filtrats CLN16 et CTHA3. Pour les autres traitements, on a détecté de un à trois QTL par traitement, et au total 14 QTL différents, avec des valeurs de R^2 allant de 10 % à 20 % (Tab 3-33). On a désigné les positions de ces QTL en indiquant leur groupe de liaison et la distance (en cM) séparant leur position de la position 0 marquant le début du groupe (par exemple g2-26 pour le QTL situé sur le groupe de liaison g2 à 26 cM du début du groupe) (Fig 3.27).

- Deux QTL ont été détectés conjointement aux positions **g2-26** et **g4-95** pour la cassiicoline purifiée (Tox5) d'une part, et avec filtrats de type C/Cas1 d'autre part : CCP, CCI501 et CNIG404. Parmi tous les filtrats de type C/Cas1, seul CCAM3 n'a pas permis de détecter ces deux QTL. Chacun de ces QTL explique de 10 à 20 % de la variance phénotypique (R^2). Pour Tox5 et CCP, ce résultat a été obtenu sur les deux sites (SOGB et Toupah). Cependant, sur le site de Toupah, on a trouvé un QTL supplémentaire pour le filtrat CCP en position **g5-73** avec $R^2 = 14$ %.

- Le QTL en position **g2-26** a également été détecté pour la notation d'intensité d'attaque en champ sur la population Pop2 à Toupah ($R^2 = 19\%$).
- Pour le filtrat de la souche CCP mutée pour le gène *CasI* (CCP*) les QTL **g2-26** et **g4-95** et **g5-73** ne sont plus détectés. En revanche, on a détecté pour ce traitement deux QTL aux positions **g3-11** et **g9-62**, expliquant 16 et 11 % de la variation phénotypique respectivement. Le QTL en position **g9-62** est commun à la réponse aux trois filtrats CCP* (type C/Cas0), CCI405 (type A4/Cas1) et CCI434 (A4/Cas0), avec des effets R^2 de 11 %, 10 % et 11 % respectivement.
- Un QTL en position **g4-32** a été détecté pour trois filtrats de type A4/Cas0 (CCI13, CCI6 et CSRI5), avec des effets R^2 égaux à 14 %, 11 % et 12 % respectivement.
- Un QTL en position **g6-26** a été détecté pour les filtrats CCI405 (type A4/Cas1), CCI434 et CCI403 (tous deux de type A4/Cas0) ; il expliquait 20 %, 13 % et 10 % de la variation phénotypique respectivement.
- Un QTL en position **g13-102** a été détecté pour les filtrats CCAM3, CSRI5 et CSB16, de trois types différents, avec des effets R^2 égaux à 11 %, 11 % et 13 % respectivement.
- Un QTL en position **g9-122** a été détecté pour le filtrat CIND3 (type A4/Cas0) avec $R^2 = 11\%$.
- Un QTL en position **g12-53** a été détecté pour le filtrat CCAM3 (C/Cas1) avec $R^2 = 13\%$.
- Un QTL en position **g14-64** a été détecté pour le filtrat TSB1 (B4/Cas5) avec $R^2 = 16\%$.
- Un QTL en position **g16-11** a été détecté pour le filtrat CCI403 (A4/Cas0) avec $R^2 = 12\%$.
- Un QTL en position **g16-77** a été détecté pour le filtrat CIND3 (type A4/Cas0) avec $R^2 = 11\%$.
- Un QTL en position **g18-87** a été détecté pour la notation d'intensité d'attaque en champ, pour la population Pop1 testée à la SOGB ($R^2 = 13\%$). Ce QTL n'était révélé par aucun traitement toxinique.

Tableau 3-33. Détection de QTL associés d'une part au critère %FE mesuré pour 19 traitements toxiques (blancs inclus) et d'autre part aux deux notations d'attaque de maladie en champ pour le phénotypage des populations Pop1 et Pop2 (famille PB260 x RRIM600) à la SOGB et à Toupah.

Le nom de chaque QTL est indiqué par son groupe de liaison (g) et la distance à l'origine du groupe en cM (exemple : QTL g2-26 situé sur le groupe de liaison g2 à 26 cM de l'origine du groupe). R^2 = pourcentage expliqué par le QTL de la variation phénotypique observée entre les individus. Seuls les R^2 des QTL significatifs sont présentés (seuil de signification des QTL : LOD = 4.2 pour un risque global α = 0.05. Observations des maladies en champ réalisées en novembre 2014 (SOGB) et septembre 2015 (Toupah). Logiciel MapQTL6, méthode Interval Mapping (Van Ooijen, 2009).

Trait.	Type de souche	Essai	R ² (%)														
			g2-26	g3-11	g4-32	g4-95	g5-73	g6-26	g9-62	g9-122	g12-53	g13-102	g14-64	g16-11	g16-77	g18-87	
Tox5	C/Cas1	Pop1	17	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pop2	17	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CCP	C/Cas1	Pop1	12	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pop2	12	-	-	13	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CCP*	C/Cas0	Pop2	-	16	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	
CCI501	C/Cas1	Pop2	16	-	-	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CNIG404	C/Cas1	Pop2	20	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CCAM3	C/Cas1	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	13	11	-	-	-	-	
CCI405	A4/Cas1	Pop2	-	-	-	-	-	20	10	-	-	-	-	-	-	-	
CCI434	A4/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	13	11	-	-	-	-	-	-	-	
CCI403	A4/Cas0	Pop2	-	13	-	-	-	10	-	-	-	-	-	12	-	-	
CIND3	A4/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	11	-	
CCI13	A4/Cas0	Pop1	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CCI6	A4/Cas0	Pop1	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CSRI5	A4/Cas0	Pop1	-	-	12	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	
CSB16	B4/Cas5	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-	
TSB1	B4/Cas5	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	
CLN16	A4/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CTHA3	F1/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cz		Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tox0		Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Maladie en champ Nov. 2014		Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	
Maladie en champ Sep. 2015		Pop2	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CCP* : filtrat de la souche CCP mutée pour la délétion du gène *Cas1*

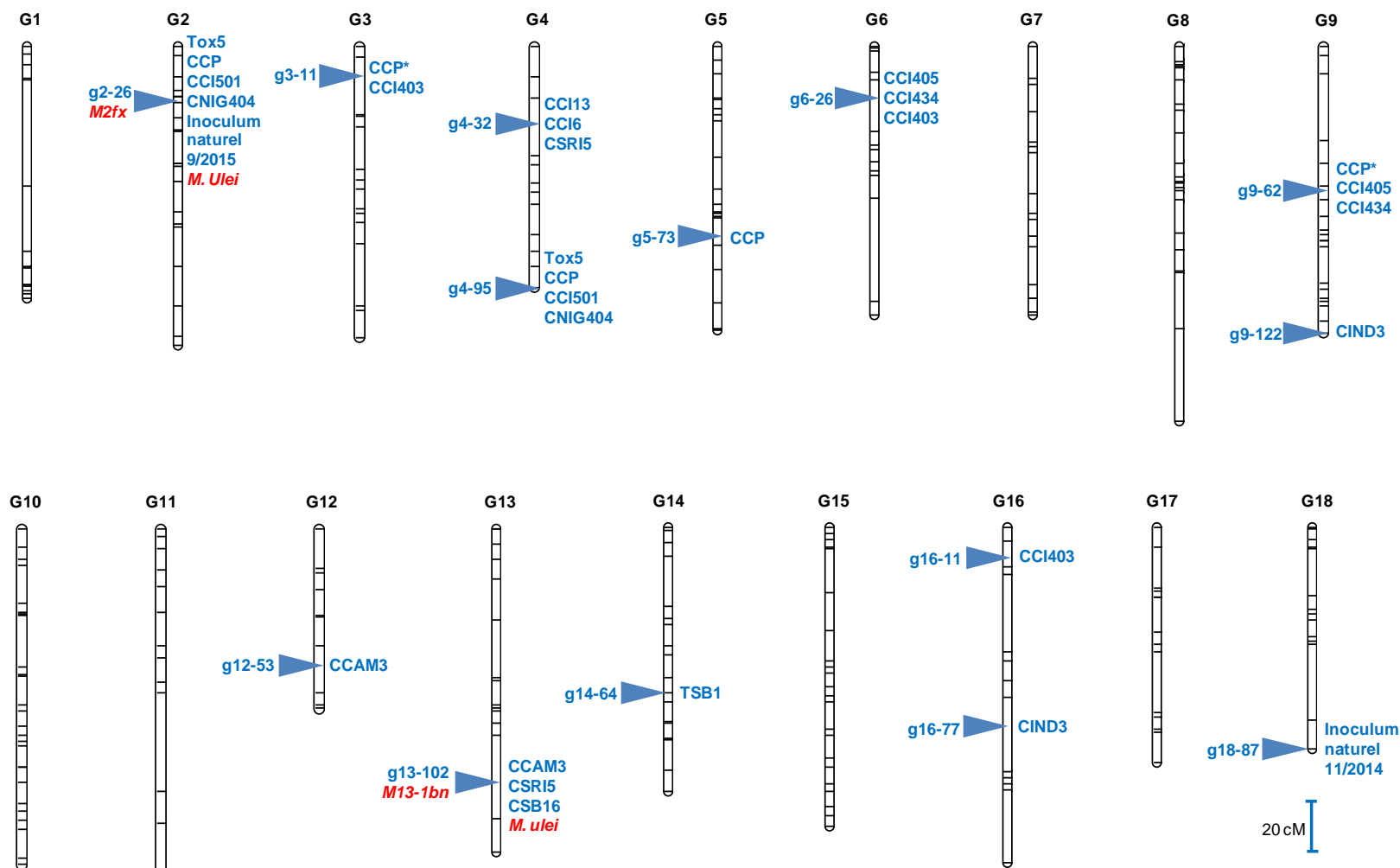


Fig 3.27: Cartographie de QTL.

Détection de QTL associés au critère %FE mesuré lors du phénotypage des populations Pop1 et Pop2 (famille PB260 x RRIM600). La position de chaque QTL est indiquée par son groupe de liaison et la distance à l'origine du groupe en cM (exemple : QTL g2-26 situé sur le groupe de liaison g2 à 26 cM de l'origine du groupe). Positions des QTL, indiqués à gauche des groupes de liaison. Traitements toxiques associés aux QTL, indiqués à droite des groupes de liaison. Deux QTL (*M2fx* et *M13-1bn*) associés à la résistance à *M. ulei* (Le Guen *et al.*, 2003 et 2013) sont co-localisés avec deux QTL identifiés dans cette étude.

Tableau 3-34. Effets alléliques des QTL détectés au critère %FE mesuré lors du phénotypage des populations Pop1 et Pop2 (famille PB260 x RRIM600) à la SOGB et à Toupah.

R² et signification des effets alléliques expliquant les QTL, pour les marqueurs voisins des QTLs (* : p<0.05; ** : p<0.01; *** : p<0.001). CCP*, filtrat de la souche CCP mutée pour la délétion du gène *Cas1*.

QTL	Marqueur	Traitement - Essai	Ratio de ségrégation	Effet allélique parental (R ²)		
				PB260	RRIM600	Interaction
g2-26	A2734	Tox5 - Pop1	1:1:1:1	10 ***	6 ***	-
		Tox5 - Pop2	1:1:1:1	10 ***	4 **	-
		CCP - Pop1	1:1:1:1	10 ***	3 *	-
		CCP - Pop2	1:1:1:1	7 **	4 *	-
		Maladie 9/15 - Pop2	1:1:1:1	4 *	14 ***	-
		CNIG404 - Pop2	1:1:1:1	13 ***	5 **	-
		CCI501 - Pop2	1:1:1:1	5 **	11 ***	-
g3-11	TAs2558	CCI403 - Pop2	1:2:1	5 *	5 *	?
		CCP* - Pop2	1:2:1	7 **	7 **	?
g4-32	a107	CCI6 - Pop1	1:1:1:1	-	-	8 ***
		CSRI5 - Pop1	1:1:1:1	-	-	9 ***
		CCI13 - Pop1	1:1:1:1	-	-	10 ***
g4-95	A2404	CCP - Pop2	1:1:1:1	10 ***	4 *	-
		Tox5 - Pop1	1:1:1:1	11 ***	-	-
		Tox5 - Pop2	1:1:1:1	14 ***	-	-
		CCP - Pop1	1:1:1:1	12 ***	-	-
		CNIG404 - Pop2	1:1:1:1	8 ***	2 *	-
		CCI501 - Pop2	1:1:1:1	13 ***	5 **	-
g5-73	T2603	CCP - Pop2	1:1	12 ***	-	-
g6-26	A2511	CCI403 - Pop2	1:1:1:1	4 *	3 *	3 *
		CCI434 - Pop2	1:1:1:1	5 ***	5 **	3 *
		CCI405 - Pop2	1:1:1:1	6 **	10 ***	3 *
g9-62	A2503	CCI405 - Pop2	1:1:1:1	7 ***	-	3 *
		CCI434 - Pop2	1:1:1:1	6 ***	-	3 *
		CCP* - Pop2	1:1:1:1	4 *	-	5 **
g9-122	A2298	CIND3 - Pop2	1:1	-	-	-
g12-53	A2428	CCAM3 - Pop1	1:1	?	?	?
g13-102	A2757	CSB16 - Pop1	1:1:1:1	-	-	7 ***
		CCAM3 - Pop1	1:1:1:1	-	-	8 ***
		CSRI5 - Pop1	1:1:1:1	-	-	8 ***
g14-64	A2435	TSB1 - Pop1	1:1:1:1	-	18 ***	3 *
g16-11	a58	CCI403 - Pop2	1:1:1:1	5 **	6 **	-
g16-77	SSH036	CIND3 - Pop2	1:1:1:1	2	7 ***	-
g18-87	a288	Maladie 11/14 - Pop1	1:2:1	12 ***	12 ***	?

3.3.3.2 Effet allélique parental pour chaque QTL

Les effets des allèles parentaux des marqueurs SSR proches des 14 QTL détectés ont été estimés pour les traitements auxquels ces QTL sont associés. Les résultats fournissent des informations sur le déterminisme génétique de la variabilité du critère %FE selon les différentes combinaisons traitement x population. Ils sont présentés dans le Tab 3-34 et commentés ci-dessous pour chaque QTL. Trois types de ségrégation (Tab 3-28) correspondant aux trois types d'effets alléliques (maternel, paternel et interaction mère x père) ont été observés:

- Neuf marqueurs présentent une ségrégation de type 1:1:1:1 (<abxcd> ou <efxeg>), avec quatre génotypes différents dans la descendance.
- Deux marqueurs présentent une ségrégation de type 1:2:1 (<hkhk>), avec trois génotypes différents dans la descendance.
- Trois marqueurs présentent une ségrégation de type 1:1 (<lmxll> ou <nnxnp>), avec deux génotypes différents dans la descendance.

L'analyse de la variance phénotypique en fonction des allèles pour chaque marqueur proche d'un QTL (Tab 3-34) a montré que :

- Pour les six combinaisons traitement x population Tox5-Pop1, Tox5-Pop2, CCP-Pop1, CCP-Pop2, CCI501-Pop2 et CNIG404-Pop2, l'effet du QTL **g2-26** est expliqué par les deux effets parentaux (différences d'une part entre les deux allèles de PB260, et d'autre part entre les deux allèles de RRIM600 pour le marqueur A2734). En revanche, pour la notation d'intensité d'attaque au champ de Pop2 à Toupah, le QTL **g2-26** est principalement expliqué par un effet paternel et de façon moins importante par un effet maternel. Pour ces six combinaisons, le QTL **g4-95** est principalement expliqué par un effet maternel dû à la différence entre les deux allèles de PB260 pour le marqueur A2404.
- Pour les trois traitements CCI13-Pop1, CCI6-Pop1 et CSRI5-Pop1, l'effet du QTL **g4-32** est principalement expliqué par l'interaction entre allèles des deux parents.
- Pour le traitement CCP-Pop2, le QTL **g5-73** est lié au marqueur T2605 qui n'est polymorphe que chez la mère PB260, et cet effet maternel est apparu hautement significatif.

- Pour les trois traitements CCI405-Pop2, CCI434-Pop2 et CCI403-Pop2, le QTL **g6-26** est expliqué par les trois sources de variation : maternelle, paternelle et interaction.
- Pour les trois traitements CCP*-Pop2, CCI405-Pop2 et CCI434-Pop2, le QTL **g9-62** est expliqué par un effet maternel et un effet d'interaction mère x père.
- Pour le traitement CIND3-Pop2, on ne peut tester au marqueur A2298 que l'effet maternel du QTL **g9-122**, et celui-ci apparaît non significatif. On peut donc supposer que l'effet provient de l'effet paternel et/ou de l'interaction.
- Pour le traitement CCAM3-Pop1, on ne peut tester au marqueur A2428 que l'effet maternel du QTL **g12-53**, et celui-ci apparaît non significatif.
- Pour les trois traitements CCAM3-Pop1, CSRI5-Pop1 et CSB16-Pop1, l'effet du QTL **g13-102** est expliqué par l'effet d'interaction.
- Pour le traitement TSB1-Pop1, l'effet du QTL **g14-64** est expliqué principalement par l'effet paternel et de façon moins importante par l'interaction.
- Pour le traitement CCI403-Pop2, l'effet du QTL **g16-11** est expliqué par les deux effets parentaux.
- Pour le traitement CIND3-Pop2, l'effet du QTL **g16-77** est expliqué principalement par l'effet paternel et de façon moins importante par l'effet maternel.

Concernant les QTL **g3-11** détectés pour les traitements CCP*-Pop2 et CCI403-Pop2, **g18-87** détecté pour la notation d'intensité d'attaque au champ de Pop1 à la SOGB, les marqueurs respectives liés TAs2558 et a288 présentent une ségrégation de type <hkxhk> qui a conduit à tester l'effet de substitution de l'allèle h par l'allèle k et l'effet de dominance de la classe génotypique hétérozygote hk par rapport à la moyenne des deux classes homozygotes hh et kk. L'effet interactif allélique entre deux allèles n'a pas été analysé.

3.3.4 Bilan des résultats de la section 3.3

Le regroupement des deux populations Pop1 et Pop2 issues de la famille PB260 x RRIM600 a permis la construction d'une carte génétique synthétique précise comportant une répartition assez équilibrée de 308 marqueurs SSR sur les 18 groupes de liaison du génome haploïde de l'hévéa. Cette carte, ainsi que les données de génotypage des 343 individus et les données de phénotypage par tests toxiques et notations d'intensité d'attaque de maladie au champ de

ces individus répartis sur les deux sites de SOGB et Toupah, ont permis d'explorer le déterminisme génétique des critères étudiés par détection de QTL.

On a ainsi détecté 13 QTL localisés sur 10 groupes de liaison différents pour les tests toxiques réalisés à partir de 15 traitements de *Corynespora* d'origines géographiques et de types génétiques. Selon les traitements toxiques, on a pu trouver un ou deux QTL par traitement, et même trois QTL dans le cas du traitement CCP-Pop2. Les pourcentages d'explication de la variation phénotypique caractérisant l'importance de l'effet des QTL (R^2) étaient modérés quels que soient les traitements (variation entre 10 et 20 %). Ces résultats, marqués par l'absence d'un QTL à effet très important quel que soit le traitement, indiquent donc, pour la famille PB260 x RRIM600 étudiée ici, l'existence d'un déterminisme génétique de type polygénique pour la réponse de l'hévéa aux différents tests toxiques. Les traitements de type C/Cas1 (CCP, CCI501, CNIG404) ont montré une forte spécificité de réponse mise en évidence par l'examen des corrélations entre les réponses aux différents traitements et confirmée par la spécificité des QTL g2-26 et g4-95 détectés pour ces traitements. L'absence de ces QTL pour le traitement CCP* de la souche CCP mutée pour la délétion du gène *Cas1*, ainsi que pour le traitement CCAM3 de type C/Cas1 mais dont on sait que le gène *Cas1* est peu exprimé dans cette souche, constituent des confirmations supplémentaires. En revanche des traitements d'autres types, notamment du type A4/Cas0 souvent rencontré en Afrique (CCI434, CCI493, CCI6, CCI13, CSRI5), sont également apparus fortement agressifs comme les souches CCP, CCI501 et CNIG404 de type C/Cas1.

Cette étude a confirmé le rôle de la toxine Cas1 dans l'agressivité des traitements porteurs de cette toxine vis-à-vis de l'hévéa. Deux QTL communs aux chromosomes g2 et g4 ont été détectés pour la toxine Cas1 et le filtrat issu de la souche d'origine CCP et pour les filtrats de nouvelles souches CCI501 et CNIG404 isolées au cours de cette thèse à partir de plantations ivoiriennes, et seulement pour ces traitements tous de type C/Cas1. D'une part, cela confirme que Cas1 est bien le déterminant majeur de la toxicité du filtrat CCP, sans doute également des filtrats CCI501 et CNIG404. Par ailleurs, pour le mutant CCP*, délété pour le gène *Cas1*, on n'a plus trouvé les deux QTL associés à la toxine purifiée Cas1.

Deux QTL différents sont détectés pour les notations de l'état sanitaire des feuilles sur deux sites différents. On ne peut pas assurer que les observations ainsi réalisées concernaient uniquement *Corynespora*, en particulier dans le cas de l'essai de la SOGB pour laquelle un QTL spécifique a été détecté. En revanche, la détection du QTL g2-26, spécifique de Cas1,

dans l'essai Pop2 à Toupah, suggère que l'attaque foliaire observée dans cet essai était probablement due à *Corynespora* avec la présence prépondérante d'une souche de type C/Cas1 dans l'inoculum naturel.

Globalement, nos résultats mettent en évidence des QTL représentant les facteurs génétiques les plus importants associés aux réponses des clones d'hévéa aux traitements de *Corynespora*. Ces facteurs monolocus ont cependant des incidences relativement modérées par rapport aux réponses polygéniques exprimées par les clones. Les effets de variation allélique expliquant ces QTL peuvent provenir essentiellement du clone maternel PB260, du clone paternel RRIM600, des deux parents de façon indépendante, ou des effets interactifs générés par la rencontre chez un descendant d'un allèle maternel et d'un allèle paternel. Cela souligne donc l'influence de la constitution génétique des deux parents du croisement étudié sur les résultats obtenus.

3.4 Analyse de la pertinence des critères mesurés (C1, C2, %FE)

La mesure de conductivité C1 mesure les électrolytes libérés en réponse au traitement. Elle est suivie par une deuxième mesure, C2, réalisée sur chaque échantillon foliaire après autoclavage. Le pourcentage de fuite d'électrolyte %FE induit par le traitement est le rapport $100 * C1 / C2$.

L'objectif de la mesure C2 est de corriger C1 en éliminant la part des effets qui serait due à la structure de l'échantillon (épaisseur, biomasse, état physiologique de la foliole ou autre) et non aux traitements eux-mêmes (clones et traitements toxiques). L'autoclavage vise à faire éclater toutes les cellules après la mesure C1. La mesure C2 est donc supposée représenter la totalité des électrolytes de l'échantillon.

Au cours des expériences de mise au point méthodologique du test toxique, nous avons voulu vérifier si le paramètre C2 était indépendant ou non des facteurs étudiés. Or il est apparu que ce n'était pas le cas, comme nous allons le montrer dans cette section. Nous avons expérimenté de nouvelles méthodes pour tenter d'optimiser la mesure de C2, mais sans réel succès. Dans cette section, nous exploitons les jeux de données présentés dans les sections précédentes, en particulier l'analyse des réponses à différents traitements toxiques d'une gamme de clones (section §3.2), mais aussi de la descendance F1 de la famille PB260 x RRIM600 (section §3.3), pour comprendre la pertinence des critères C1, C2 et %FE mesurés. Nous discuterons donc les résultats précédents au regard de cette analyse critique.

Tableau 3-35. Dispositif d'étude de la variabilité intra-clonale du paramètre C2.

L'analyse a été menée sur trois plants du clone RRIC100. Pour chaque plant, huit folioles d'une même unité de croissance (UC) ont été prélevées : quatre dans la partie supérieure (stade de développement « C ») et quatre dans la partie inférieure (stade de développement « C+ »). Pour chaque foliole, la conductivité maximale C2 a été mesurée sur deux rondelles foliaires.

Clone	Stade foliaire (âge foliaire depuis le débourrement)	Plant1	Plant2	Plant3
RRIC100	C (23-26 jours)	8	7	7
	C+ (27-30 jours)	12	12	12

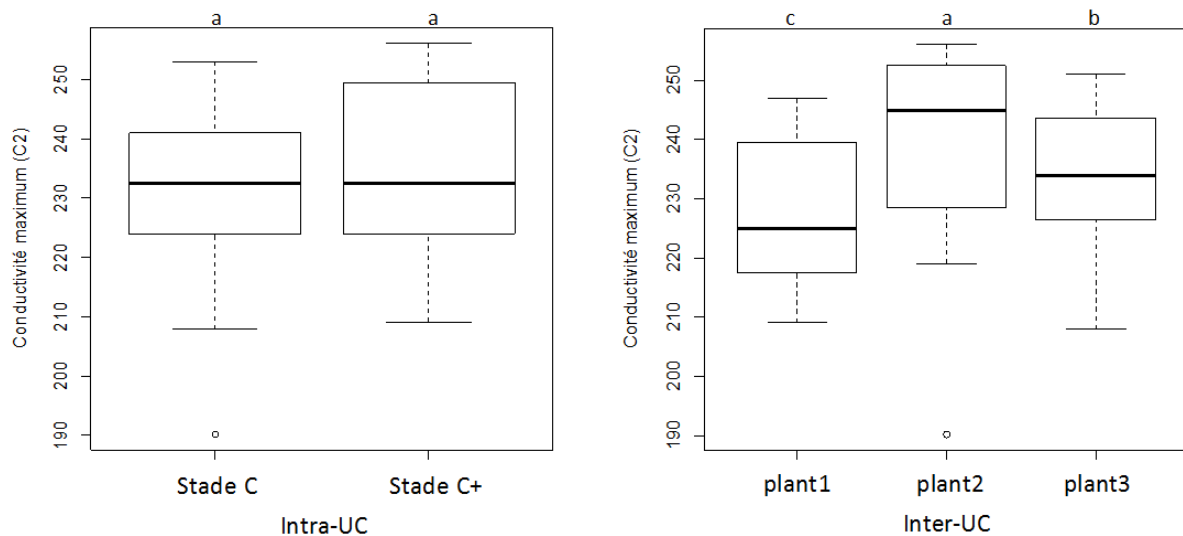


Fig 3.28: Variabilité de C2 intra- et inter-unité de croissance (UC).

Les mesures de C2 après autoclavage ont été analysées pour deux stades de développement des feuilles au sein d'une même UC et pour trois UC de plantes différentes du clone RRIC100. A gauche : distributions des valeurs de C2 pour les deux stades (C ou C+). A droite : distribution des valeurs de C2 pour les 3 plantes. Lettres en haut : significativité des différences intra- ou inter-UC (test SNK, risque $\alpha=0.05$).

Tableau 3-36. Analyse de variance du critère C2 pour le facteur de stade foliaire au sein d'une unité de croissance (UC) et pour la variation entre des unités portées par des plantes différentes.

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Plant	2	3600.6	1800.3	13.8	1.5e-05***	30
Stade	1	221.1	221.1	1.7	0.2	2
Plant x Stade	2	1426.6	713.3	5.5	0.007**	12
Residus	52	6774	130.27			56

dl : Degrés de liberté ; SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens

Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité '***' $p < 0.001$ '**' $p < 0.01$ '*' $p < 0.05$

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport SCE sur SCE totaux

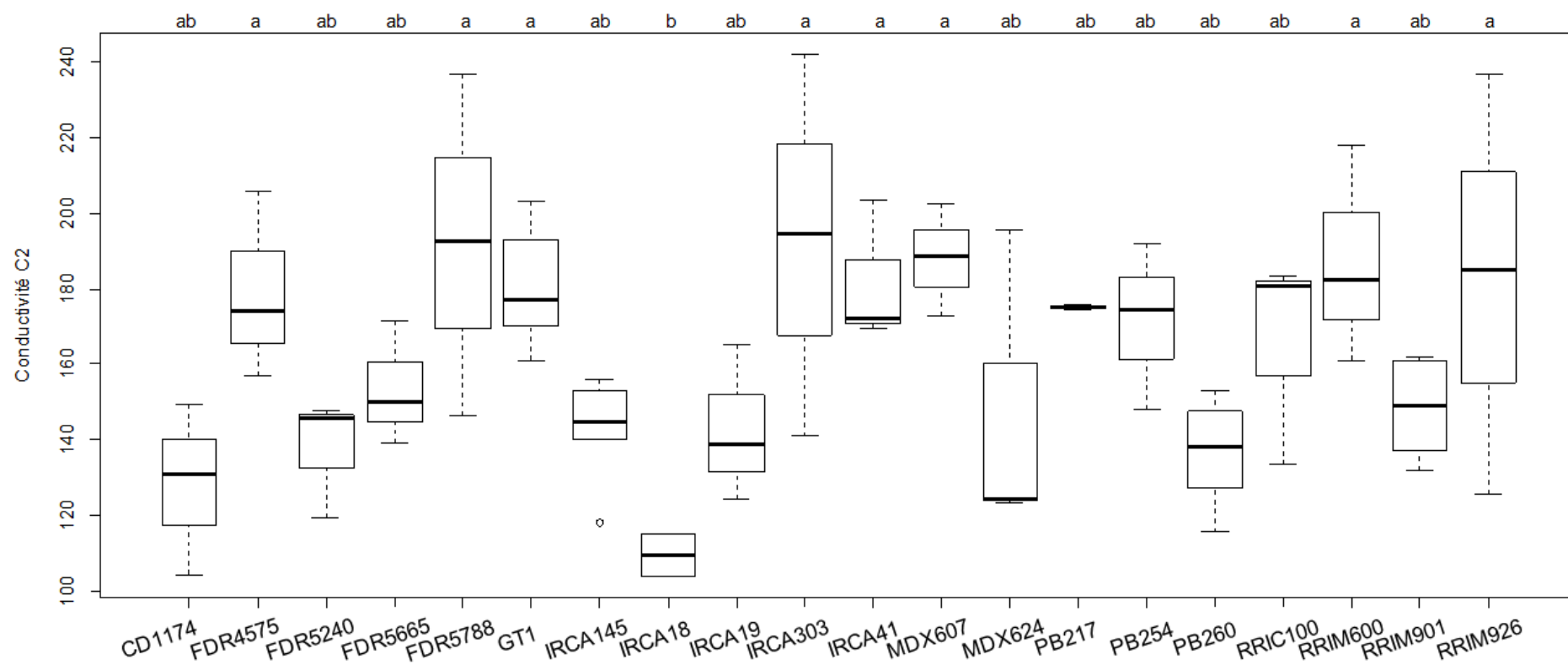


Fig 3.29: Expérience CI. Variabilité inter-clonale du critère C2 : distribution des données C2 mesurées sur 20 clones en réponse au traitement à blanc Tox0. Lettres en haut : significativité des différences inter-clonales (test SNK, risque $\alpha=0.05$).

3.4.1 Etude de facteurs de variation du paramètre C2

Pour tester la pertinence du paramètre C2, et réfléchir à la meilleure façon de l'utiliser pour la correction des données C1, nous avons étudié différents facteurs pouvant influencer C2.

3.4.1.1 Variabilité intra-clonale du paramètre C2

Une expérience spécifique a été menée en absence de traitement toxinique pour étudier la variabilité intra-clonale de C2, au sein d'une même unité de croissance (UC) ou entre unités de croissance différentes d'un même clone. L'essai a été réalisé sur trois UC de plants différents du clone RRIC100. Pour chaque UC, on a prélevé de 7 à 8 folioles dans la partie supérieure (stade de développement « C ») et 12 dans la partie inférieure (stade de développement « C+ »). Pour chaque foliole, un à trois couples de rondelles ont été prélevés (selon la taille des feuilles), sur lesquels des mesures de conductivité C2 après autoclavage ont été réalisées (Tab 3-35). L'analyse statistique n'a pas montré d'effet significatif du stade de développement des folioles (effet « stade ») sur la variation de C2. Autrement dit, il n'y a pas de différence significative de C2 entre les folioles de la même UC. En revanche, l'effet « plant » est significatif, de même que l'interaction « Plant x Stade de développement » (Fig 3.28 et Tab 3-36).

Indépendamment de l'effet des répétitions sur la variation des moyennes, la correction de C1 par C2 grâce au calcul de %FE pourrait donc contribuer à réduire la variation résiduelle de l'estimation des réponses des clones aux traitements toxiques, variation en partie liée à des variations entre plantes d'un même clone en l'absence de tout traitement toxinique.

3.4.1.2 Variabilité inter-clonale du paramètre C2

La variabilité inter-clonale de C2, en l'absence de traitement toxinique, a été analysée à partir du jeu de données de l'expérience menée en Côte d'Ivoire, sur les 20 clones soumis au traitement à blanc Tox0 (eau). Cette analyse a révélé une certaine variabilité de C2 entre les clones (Fig 3.29), avec des valeurs médianes variant de 110 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (IRCA18) à 193 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (IRCA303). Cependant, l'analyse statistique de ces résultats indique que le clone IRCA18, qui a généré les valeurs C2 les plus faibles, est le seul clone significativement différent des autres. Les autres clones, bien que pouvant être classés en deux catégories (catégorie de niveau de signification « a » ou « ab ») ne sont pas significativement différents entre eux. (Fig 3.29).

La valeur de C2 d'IRCA18, significativement inférieure à celles des autres clones en l'absence de tout traitement toxique suggère l'intérêt d'une correction de C1 par C2. Pour le justifier, il faudrait cependant vérifier que cette variation interclonale de C2, observée ici seulement du fait de la présence d'IRCA18, n'est pas en elle-même un facteur intervenant dans la résistance ou la sensibilité des clones aux traitements toxiques. En effet cette correction a pour effet de réduire la variation des réponses des clones aux traitements toxiques. Dans le cas présent, la correction de C1 par C2 aurait pour effet d'augmenter la réponse %FE de IRCA18 aux traitements agressifs.

3.4.1.3 Variabilité de C2 en réponse aux traitements toxiques.

Nous avons repris le jeu de données de l'expérience présentée dans le paragraphe §3.1.3 et le Tab 3-5 qui visait à étudier la zone de prélèvement optimum des rondelles foliaires et nous avons analysé la variabilité de C2 en présence de toxine. L'essai avait été réalisé sur le clone sensible PB217 avec quatre concentrations en toxine Cas1 purifiée à 0, 1, 5 et 10 ng/μL (Tox0, Tox1, Tox5 et Tox10 respectivement). Les prélèvements des rondelles avaient été effectués au point de dépôt de la toxine (niveau n0) et à des positions de plus en plus éloignées, à 2, 4, 6 cm (n1, n2, n3 respectivement) (Tab 3-5). Au niveau n0, la conductivité C2 est apparue significativement influencée par le traitement toxique à la plus forte concentration (Tox10) mais pas (ou de manière non significative) par les concentrations en toxine plus faibles (Fig 3.30). Pour mémoire, le paramètre %FE mesuré au point n0 était lui aussi corrélé positivement à la concentration en toxine, mais avec un effet significatif dès la plus faible concentration (Fig 3.30). Pour C2 comme pour %FE, l'effet toxine est non significatif pour les rondelles distantes n1, n2 et n3.

Nous avons ensuite élargi cette étude en analysant la variance du critère C2 sur une gamme de 20 clones traités par la toxine Cas1 à quatre concentrations (0, 1, 5 et 10 ng/μL), à partir du jeu de données de l'expérience menée en Côte d'Ivoire. Cette analyse a montré un effet « clone » important (33 % de la variance totale), un effet « traitement » significatif mais moins important (12 % de la variance totale), et une absence d'interaction significative « clone x traitement » (Tab 3-37).

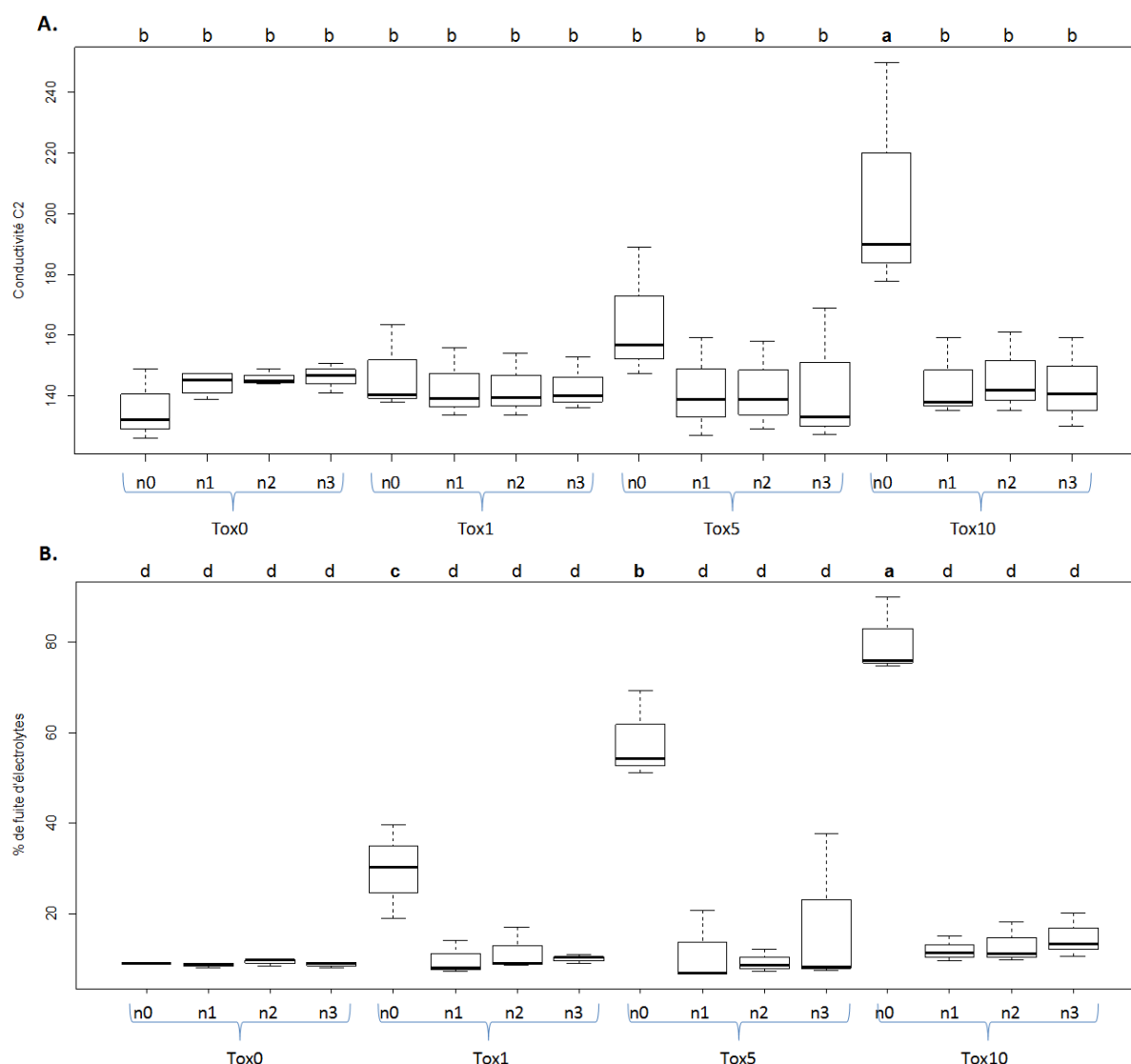


Fig 3.30: Distribution des valeurs de C2 (A) en comparaison avec les valeurs %FE (B) pour différentes concentrations de toxine et différents niveaux de prélèvement des rondelles par rapport au point de dépôt de la toxine (n0).

Quatre concentrations en toxine Cas1 purifiée à 0, 1, 5 et 10 ng/μL (Tox0, Tox1, Tox5 et Tox10). Clone PB217. Trois plants par motif. Lettres en haut : significativité des différences entre les motifs (test SNK, risque $\alpha=0.05$).

Tableau 3-37. Analyse de variance du critère C2 sur 20 clones traités avec quatre concentrations en toxine Cas1 purifiée (0, 1, 5 et 10 ng/μL).

Le jeu de données C2 est extrait à partir de l'expérience menée en Côte d'Ivoire.

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Clone	19	149508	7869	9.9	< 2,2e-16***	33
Traitement	3	56446	18815	23.6	1.7e-13***	12
Clone x Traitement	57	44299	777	1.0	1	10
Residus	254	202629	798			45

dl : Degrés de liberté ; SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens ; Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité de F > de Fcritique: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport SCE sur SCE totaux

Tableau 3-38. Dispositif d'étude de différentes méthodes de mesure de C2.
Sur le clone PB217, quatre concentrations en toxine (0, 1, 5 et 10 ng/μL) ont été appliquées, avec trois répétitions (trois plantes) par combinaison.

Clone	Concentration en toxine	Méthode de mesure C2		
		Autoclavage sans broyage	Broyage après autoclavage	Broyage avant autoclavage
PB217	Tox0	3	3	3
	Tox1	3	3	3
	Tox5	3	3	3
	Tox10	3	3	3

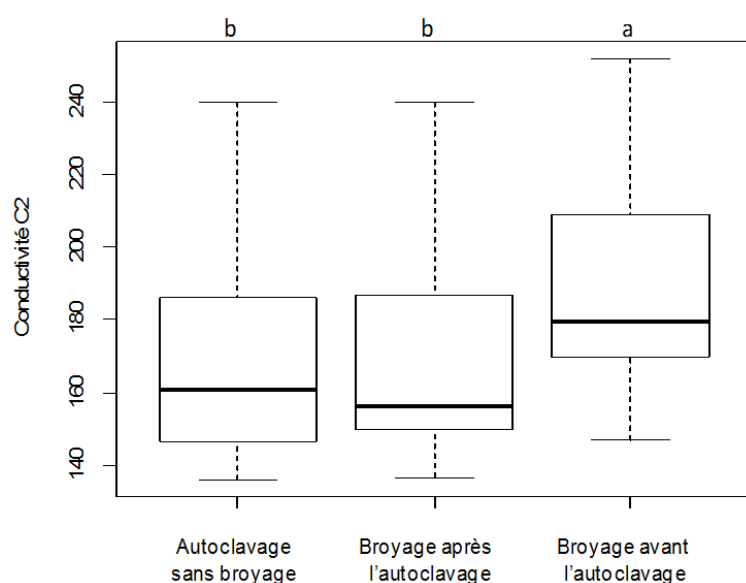


Fig 3.31: Distributions des données C2 en fonction des méthodes pratiquées pour libérer les électrolytes.

En haut : significativité des différences (test SNK, risque $\alpha=0.05$).

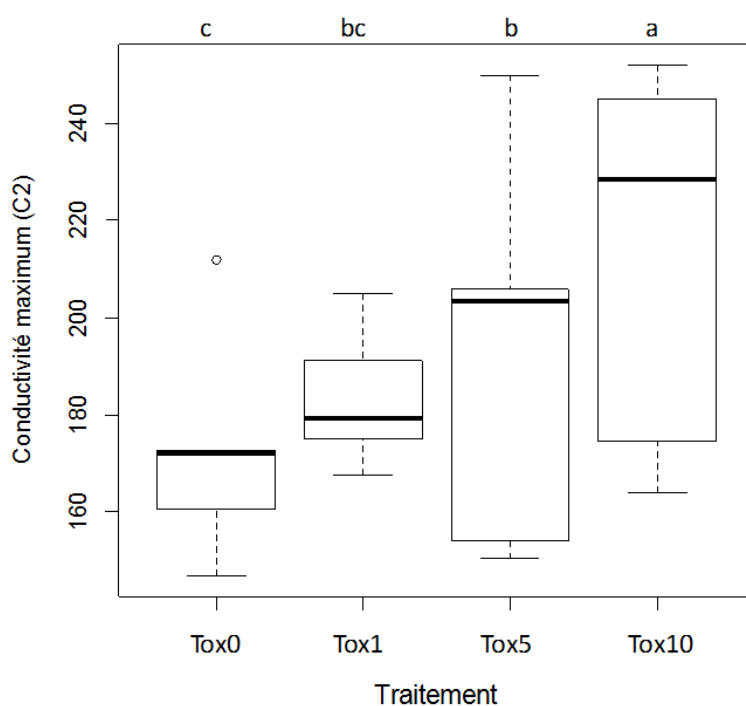


Fig 3.32: Distribution des données C2 obtenues par la méthode « broyage avant autoclavage », en fonction de la concentration en toxine.

En haut : significativité des différences entre les traitements (test SNK, risque $\alpha=0.05$).

3.4.2 *Test de différentes méthodes pour optimiser la mesure C2*

L'influence du traitement toxinique sur la mesure C2 suggère que l'autoclavage ne réussit que partiellement à libérer les électrolytes de chaque échantillon. Ceci constitue un problème car on corrige le critère C1 avec un critère C2 qui est lui-même influencé (dans le même sens que C1) par les traitements étudiés. C2 n'est donc pas un facteur de correction fiable. Nous avons donc recherché des méthodes pour optimiser la mesure C2.

Nous avons testé si une étape de broyage des rondelles en plus de l'autoclavage permettait de libérer la totalité des électrolytes. Le dispositif est présenté dans le Tab 3-38: les feuilles saines au stade C provenant de plants en champ du clone PB217 sensible à la toxine Cas1 ont été traitées avec quatre concentrations (0, 1, 5 et 10 ng/μL), et analysées selon les conditions standards du test toxinique. Pour chaque traitement, après la mesure C1, trois méthodes de libération des électrolytes totaux ont été testées : l'autoclavage seul (sans broyage), l'autoclavage avant broyage, et l'autoclavage après broyage.

L'analyse des mesures de C2 montre une libération d'électrolytes plus importante pour la méthode « broyage avant autoclavage » comparativement aux deux autres méthodes. Il n'y a pas de différence significative de C2 entre « autoclavage sans broyage » et « broyage après l'autoclavage » (Fig 3.31). Cependant, même avec cette méthode, C2 reste corrélé à la concentration en toxine (Fig 3.32). Comme l'étape de broyage rajoute une contrainte très importante en terme d'expérimentation, et qu'elle ne suffit pas à éliminer complètement la dépendance de C2 à la concentration en toxine, elle a été abandonnée.

3.4.3 *Comparaison des critères C1 et %FE pour rendre compte de la réponse d'une gamme de clones aux traitements toxiques de *Corynespora cassiicola**

Nous avons analysé les réponses à différents traitements d'une gamme de clones pour les différents critères mesurés C1 et C2 et nous avons comparé avec le critère %FE analysé dans l'expérience menée en Côte d'Ivoire : 25 traitements toxiques (filtrats de 20 souches différentes, trois concentrations de Cas1 purifiée et deux traitements à blanc) appliqués sur 20 clones d'hévéa provenant en champ. Le critère C1 rend compte de la quantité d'électrolytes libérés par l'échantillon sous l'impact des traitements, avant autoclavage. Le critère C2 rend compte de la quantité d'électrolytes totaux libérable par l'échantillon après traitement toxinique et autoclavage. Le pourcentage de fuite d'électrolytes est calculé par la formule $100 \times C1/C2$.

L'analyse de variance du critère C1 sur ce jeu de données a montré la significativité des effets « clone », « traitement » et « interaction clone : traitement » (Tab 3-39). Ces effets expliquent au total 67 % de la variance du modèle statistique, avec des contributions respectives de 20, 24 et 23 %. Pour comparaison, on a obtenu avec le critère %FE, sur ce jeu de données, des contributions respectives de 20, 27 et 23 %. Les contributions respectives des trois facteurs à la variation totale sont donc comparables pour les deux critères.

Tableau 3-39. Analyse de variance des critères C1 et %FE mesurés sur 20 clones en réponse à 25 traitements, en Côte d'Ivoire.

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Critère C1						
Clone	19	1087273	57225	40,5	< 2.2e-16***	20
Traitement	24	1293462	53894	38,1	< 2.2e-16***	24
Clone x Traitement	436	1282692	2942	2,1	< 2.2e-16***	23
Résidus	1294	1828342	1413			33
Critère %FE						
Clone	19	203260	10697.9	43.8	< 2.2e-16***	20
Traitement	24	273058	11377.4	46.6	< 2.2e-16***	27
Clone x Traitement	436	235278	539.6	2.2	< 2.2e-16***	23
Résidus	1294	315985	244.2			30

dl : Degrés de liberté ; SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens ; Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité de F > de Fcritique: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport des SCE sur SCE totaux

Tableau 3-40. Analyse de variance du critère C2 mesuré sur 20 clones en réponse à 25 traitements, en Côte d'Ivoire

Source de variation	dl	SCE	CM	Valeur F	Pr (>F)	R ² (%)
Clone	19	503384	26494	33,9	< 2.2e-16***	20
Traitement	24	280947	11706	15	< 2.2e-16***	10
Clone x Traitement	436	759375	1742	2,2	< 2.2e-16***	30
Résidus	1294	1011611	782			40

dl : Degrés de liberté ; SCE : Sommes des Carrés des Ecart

CM : Carrés Moyens ; Valeur F de Fisher calculée par le rapport CME/CMR

Pr (>F) : Niveaux de significativité de F > de Fcritique: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

R² (%) : Contribution à la variation totale calculée par le rapport des SCE sur SCE totaux

L'analyse de variance du critère C2 sur ce jeu de données a montré la significativité des effets « clone », « traitement » et « interaction clone x traitement » (Tab 3-40). Ces effets expliquent au total 60 % de la variance du modèle statistique, avec des contributions respectives de 20, 10 et 30 %.

L'analyse de corrélation entre les critères mesurés (C1, C2 et %FE) en réponse de 20 clones aux traitements toxiques (Tab 3-41) a montré que :

- %FE, qui constitue le critère corrigé de C1 par C2, est en corrélation positive forte avec C1 quels que soient les clones considérés. Le coefficient de corrélation global entre %FE et C1 est très élevé ($r = 0.99$). Ceci suggère que les deux critères rendent compte de la même manière de la réponse de clones aux traitements.
- La conductivité C1 est positivement corrélée avec C2 quels que soient les clones considérés, avec des coefficients de corrélation variant de 0.67 (pour MDX624) à 0.98 (pour IRCA145). Le coefficient de corrélation global est significatif ($r = 0.84$). Ceci peut être dû à deux causes : d'une part une cause liée aux variations de structure des échantillons indépendamment des traitements (clones et traitements toxiques), et dont il faudrait donc éliminer l'effet sur C1, et l'autre liée à un effet des clones et/ou des traitements toxiques (les facteurs étudiés dans les expériences de test toxique) sur le critère C2, dont la correction conduirait à une réduction de la variation des effets étudiés.
- Le critère %FE est moins fortement corrélé avec C2 qu'avec C1 : on observe des coefficients de corrélation entre %FE et C2 variant de 0.56 (pour MDX624) à 0.97 (pour IRCA145). Le coefficient de corrélation global entre C2 et %FE pour l'ensemble de combinaison clone x traitement vaut 0.77.

L'analyse de corrélation entre les critères moyens C1, C2 et %FE des traitements toxiques a montré le même résultat que celui obtenu pour les critères moyens des clones : %FE est fortement corrélé positivement avec la conductivité C1 quels que soient les traitements considérés ($r = 0.95$). De la même façon, la conductivité C2 est corrélée avec C1 ($r = 0.73$) et %FE ($r = 0.53$) (Tab 3-42).

La corrélation positive importante entre les deux critères C1 et %FE devrait conduire aux mêmes résultats concernant l'estimation des réponses des clones aux traitements toxiques avec le critère C1 et le critère %FE. Pour le vérifier, nous avons comparé les deux analyses. La classification hiérarchique sur composantes principales des 480 combinaisons en réponse à C1 et %FE a permis de classer les traitements en trois clusters distincts (Tr1, Tr2 et Tr3) et les clones également (CL1, CL2 et CL3) (Fig 3.33), comme détaillé ci-dessous.

Tableau 3-41. Expérience CI. Coefficients de corrélation de Pearson entre les moyennes par clone en fonction des critères mesurés C1, C2 et %FE, pour une gamme de 20 clones d'hévéa en réponse à 25 traitements.

Clone	Coefficient de corrélation (r)		
	C1-%FE	C1-C2	C2-%FE
CD1174	1.00	0.84	0.81
FDR4575	0.98	0.89	0.79
FDR5240	0.99	0.76	0.72
FDR5665	0.99	0.78	0.72
FDR5788	0.99	0.78	0.68
GT1	0.96	0.82	0.66
IRCA18	1.00	0.87	0.85
IRCA19	0.99	0.97	0.95
IRCA41	0.99	0.80	0.74
IRCA145	1.00	0.98	0.97
IRCA303	0.99	0.90	0.87
MDX607	0.99	0.89	0.86
MDX624	0.99	0.67	0.56
PB217	0.98	0.82	0.71
PB254	0.97	0.77	0.63
PB260	0.98	0.89	0.81
RRIC100	0.99	0.93	0.91
RRIM600	0.99	0.77	0.69
RRIM901	0.99	0.77	0.71
RRIM926	0.98	0.81	0.68
<i>Moyenne</i>	<i>0.99</i>	<i>0.84</i>	<i>0.77</i>

Tableau 3-42. Expérience CI. Coefficients de corrélation de Pearson entre les moyennes par traitement en fonction des critères mesurés C1, C2 et %FE, pour une gamme de 20 clones d'hévéa en réponse à 25 traitements.

Clone	Coefficient de corrélation (r)		
	C1-%FE	C1-C2	C2-%FE
CCAM3	0.95	0.71	0.50
CCI6	0.94	0.49	0.18
CCI13	0.94	0.52	0.22
CCI402	0.94	0.61	0.34
CCI403	0.97	0.77	0.61
CCI405	0.98	0.68	0.54
CCI416	0.97	0.65	0.48
CCI423	0.98	0.80	0.69
CCI434	0.95	0.79	0.56
CCI449	0.98	0.86	0.78
CCI501	0.88	0.78	0.41
CCP*	0.95	0.76	0.54
CCP	0.98	0.72	0.57
CIND3	0.90	0.73	0.38
CLN16	0.91	0.67	0.36
CNIG404	0.92	0.87	0.65
CSB16	0.97	0.86	0.77
CSRI5	0.94	0.70	0.44
CTHA3	0.98	0.79	0.68
Tox1	0.98	0.66	0.52
Tox5	0.97	0.81	0.66
Tox10	0.96	0.89	0.73
TSB1	0.98	0.75	0.63
Moyenne	0.95	0.73	0.53

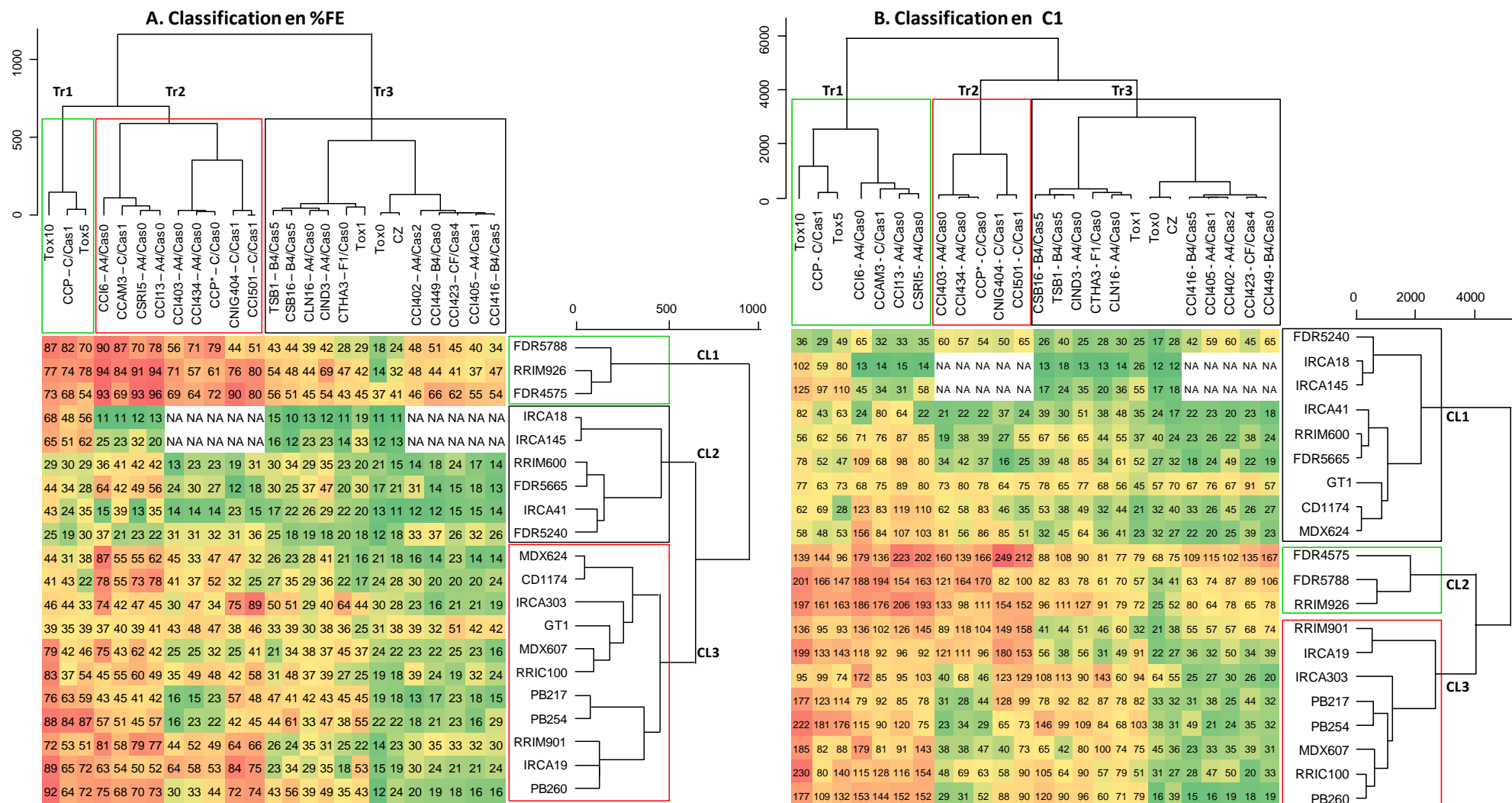


Fig 3.33: Expérience CI. Classification des clones (CL) et des traitements (Tr), d'après les critères %FE (A, à gauche) et C1 (B, à droite) mesurés sur 20 clones en réponse à 25 traitements.

Comparaison des critères C1 et %FE selon les classifications des profils d'agressivité de 25 traitements toxiques

D'après leur agressivité sur les 20 clones en réponse en C1, les 25 traitements sont séparés globalement en trois grands clusters (graphe B, Fig 3.33):

- Le cluster Tr1 correspond à sept traitements très agressifs, divisés en deux sous-clusters. L'un regroupe la toxine Cas1 purifiée (Tox5 et Tox10) et le filtrat de la souche d'origine (CCP) qui sont très agressifs sur les clones du cluster CL2 et CL3, mais moyennement agressifs sur les clones de CL1. L'autre regroupe les filtrats de quatre souches (CCI6, CCI13 et CSRI5 du même type A4/Cas0 et CCAM3 du type C/Cas1) ; il ressemble au premier sous-cluster, mais les filtrats sont peu agressifs sur les trois clones FDR5240, IRCA18 et IRCA145.
- Le cluster Tr2 regroupe des traitements en moyenne assez agressifs, divisés en deux sous-clusters. L'un regroupe les traitements CCI403, CCI434, CCP* (mutant), qui sont agressifs sur les clones du cluster CL2, mais peu agressifs sur les clones des clusters CL1 et CL3. Le deuxième sous-cluster regroupe CNIG404 et CCI501 (type C/Cas1) ; il est semblable au premier sous-cluster mais diffère légèrement par une agressivité relativement plus forte sur les clones PB217 et IRCA303.
- Le cluster Tr3 est divisé en trois sous-clusters. Le premier regroupe les filtrats peu agressifs CSB16, TSB1, CIND3, CTHA3, CLN16, de types B4/Cas5, A4/Cas0, et F1/Cas0, ainsi que Tox1, qui sont moyennement agressifs sur les clones du cluster CL2 et CL3, et peu agressifs sur les clones du cluster CL1. Le deuxième regroupe les traitements à blanc (Cz et Tox0) non agressifs sur l'ensemble des clones. Enfin le troisième sous-cluster regroupe des traitements (CCI416, CCI405, CCI402, CCI423 et CCI449, de type B4/Cas5, A4/Cas1, A4/Cas2, CF/Cas4 et B4/Cas0 respectivement, tous originaires de Côte d'Ivoire) qui sont peu agressifs sur tous les clones sauf FDR4575.

En comparaison avec la classification des traitements en trois clusters obtenue avec le critère %FE (graphe A, Fig 3.33), les résultats obtenus avec le critère C1 montrent à peu près la même chose. Pour les traitements toxiques, les six sous-clusters sont les mêmes. Cependant le sous-cluster regroupant les quatre traitements agressifs CCI6, CCI13, CSRI5 et CCAM3 est regroupé avec CCP, Tox5 et Tox10 dans le cluster Tr1 dans le cas du critère C1

mais distinct de ces traitements et regroupé avec CCP*, CNIG404 et CCI501 dans le cas du critère %FE. Cette distinction paraît faible, notamment si l'on note que CNIG404 et CCI501 sont des filtrats de type C/Cas1, donc à ce titre voisins de CCP, Tox5 et Tox10.

Comparaison des critères C1 et %FE selon les classifications des profils de sensibilité de 20 clones

Pour le critère C1 et pour les 25 traitements, les 20 clones sont classés en trois clusters (Fig 3.33).

- Le cluster CL1 contient neuf clones (FDR5240, IRCA18, IRCA145, IRCA41, RRIM600, FDR5665, GT1, CD1174 et MDX624) peu sensibles à tous les traitements toxiques.
- Le cluster CL2 contient les trois clones les plus sensibles (FDR4575, FDR5788, RRIM926), qui apparaissent sensibles à tous les traitements (traitements à blanc exclus) avec une réponse modulée selon l'agressivité des traitements..
- Le cluster CL3 contient huit clones (RRIM901, IRCA19, IRCA303, PB217, PB254, MDX607, RRIC100 et PB260) qui sont très sensibles aux traitements agressifs des clusters Tr1 et très peu sensibles à la plupart des traitements du cluster Tr3.

Ces résultats sont semblables à ceux qu'on obtient pour le critère %FE : les trois clones les plus sensibles FDR4575, FDR5788 et RRIM926, notamment en réponse aux traitements agressifs, le sont pour les deux critères. Les six clones FDR5240, IRCA18, IRCA145, IRCA41, RRIM600 et FDR5665 sont peu sensibles pour les deux critères. Les huit clones RRIM901, IRCA19, IRCA303, PB217, PB254, MDX607, RRIC100 et PB260 de sensibilité moyenne montrent une forte sensibilité aux traitements agressifs et une faible sensibilité aux traitements peu agressifs du cluster Tr3 pour les deux critères. Concernant les trois clones tolérants GT1, CD1174 et MDX624, ils sont regroupés dans un même sous-cluster dans le cas du critère C1, tandis que GT1 n'est pas regroupé avec CD1174 et MDX624 dans le cas du critère %FE. En fait le clone GT1 présente dans cette expérience un profil caractérisé par une sensibilité moyenne à tous les traitements, alors que ce clone est réputé résistant, et cela pourrait être dû ici à une cause artefactuelle (sensibilité particulièrement forte au stress du grattage préalable à l'application du traitement toxique).

3.4.4 Détection de QTL pour différents critères d'évaluation

Nous avons comparé les critères C1, C2 et %FE pour chacun des 11 traitements appliqués aux 189 génotypes de l'essai Pop1 de la plantation SOGB, en Côte d'Ivoire (Tab 3-43). Le résultat est semblable à celui qu'on a obtenu dans l'expérience CI portant sur 20 clones.

- Le critère %FE est très corrélé avec C1 quels que soient les traitements considérés, avec des coefficients de corrélation variant de 0.94 à 0.97. Le coefficient de corrélation global entre %FE et C1 est très élevé ($r = 0.96$). Ceci suggère que les deux paramètres rendent compte de manière comparable de l'effet des traitements toxiques.
- Le critère C2 est positivement corrélé avec C1 quels que soient les traitements considérés, avec des coefficients de corrélation variant de 0.56 à 0.68. Le coefficient de corrélation global entre C2 et C1 est de 0.63.
- Le critère C2 est corrélé positivement avec %FE, avec cependant des coefficients de corrélation faibles, variant de 0.33 à 0.51. Le coefficient de corrélation global entre C2 et %FE est assez faible avec $r = 0.41$. On aurait pu attendre une corrélation négative puisque C2 est au dénominateur de la formule de calcul de %FE. En fait, la faible variabilité de C2, relativement à celle de C1, explique la faible influence de C2 sur %FE.

Tableau 3-43. Coefficients de corrélation de Pearson entre les moyennes par traitement, en fonction des critères mesurés (C1, C2) ou calculé (%FE).

Cette analyse porte sur la réponse des 189 génotypes de l'essai Pop1 à la SOGB (Côte d'Ivoire) vis-à-vis de 11 traitements toxiques (10 filtrats et la cassiicoline purifiée Tox5).

Clone	Coefficient de corrélation (r)		
	C1-%FE	C1-C2	C2-%FE
CCAM3	0.95	0.62	0.38
CCI6	0.97	0.69	0.51
CCI13	0.96	0.67	0.47
CCP	0.95	0.67	0.43
CIND3	0.97	0.66	0.48
CLN16	0.95	0.61	0.38
CSB16	0.96	0.6	0.39
CSRI5	0.96	0.68	0.48
CTHA3	0.95	0.64	0.4
Tox5	0.96	0.57	0.33
TSB1	0.94	0.56	0.29
Moyenne	0.96	0.63	0.41

Tableau 3-44. Comparaison des QTL détectés sur la base du critère C1 comparativement au %FE.

QTL associés conjointement aux deux critères C1 et %FE en jaune, et QTL détectés uniquement par %FE en gris. R² : valeurs obtenues avec le critère C1 pour les QTL détectés également par ce critère ; valeurs obtenues avec le critère %FE pour les QTL détectés seulement par ce critère.

Trait.	Type de souche	Pop	R ² (%)													
			g2- 26	g3- 11	g4- 95	g4- 32	g5- 73	g6- 26	g9- 62	g9- 122	g12 -53	g13- 102	g14 -64	g16 -11	g16 -77	g18 -87
Tox5	C/Cas1	Pop1	14	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Pop2	16	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCP	C/Cas1	Pop1	13	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Pop2	10	-	11	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCP*	C/Cas0	Pop2	-	16	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-
CCI501	C/Cas1	Pop2	16	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CNIG40 4	C/Cas1	Pop2	17	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCAM3	C/Cas1	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	11	10	-	-	-	-
CCI405	A4/Cas1	Pop2	-	-	-	-	-	20	10	-	-	-	-	-	-	-
CCI434	A4/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	13	11	-	-	-	-	-	-	-
CCI403	A4/Cas0	Pop2	-	13	-	-	-	10	-	-	-	-	-	12	-	-
CIND3	A4/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	10	-
CCI13	A4/Cas0	Pop1	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCI6	A4/Cas0	Pop1	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSRI5	A4/Cas0	Pop1	-	-	-	12	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-
CSB16	B4/Cas5	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-
TSB1	B4/Cas5	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-
CLN16	A4/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTHA3	F1/Cas0	Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cz	Milieu culture	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tox0	Eau	Pop1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Pop2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Le coefficient de corrélation entre %FE et C1 est beaucoup plus fort que celui entre %FE et C2 (0.96 et 0.63 respectivement). On peut supposer que la correction de C1 par C2 n'affecte pas les résultats de l'étude concernant le phénotypage de la sensibilité de clones d'hévéas à des traitements toxiques.

On peut se demander si on obtiendrait les mêmes résultats concernant la détection de QTL avec C1, C2 et %FE, compte-tenu de la forte corrélation entre ces critères. Nous avons répété l'analyse de QTL pour les critères C1, C2 et %FE. Le jeu de données analysé est identique à celui du paragraphe §3.3.2: il comporte 341 génotypes de la descendance PB260 x RRIM600 (189 génotypes de l'essai Pop1 à la SOGB et 152 génotypes de l'essai Pop2 à la SAPH-Toupah), soumis à 17 traitements (Cas1 purifiée à 5 ng- μ L (Tox5), les filtrats de 16 souches de *Corynespora*).

Pour le critère C1, plusieurs QTL ont été détectés pour les réponses à certains traitements. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tab 3-44. Sur les 13 QTL identifiés précédemment avec le critère %FE (Tab 3-33), huit ont été confirmés avec le critère C1 : g2-26 et g4-95 (associés aux filtrats Tox5, CCP, CCI501, CNIG404), g5-73 (associé uniquement au filtrat CCP testé à Toupah), g9-122 (associé à CIND3), g12-53 (associé à CCAM3), g13-102 (associé à CCAM3 et CSB16), g14-64 (associé à TSB1) et g16-77 (associé à CIND3). Les cinq QTL qui avaient été détectés avec le critère %FE mais qui n'ont pas été détectés avec C1 sont : g3-11 (associé aux filtrats CCP* et CCI403), g4-32 (associé à CCI6, CCI13 et CSRI5), g6-26 (associé à CCI405, CCI434 et CCI403), g9-62 (associé à CCP*, CCI405 et CCI434) et g16-11 (associé à CCI403).

Aucun QTL nouveau n'a été identifié avec C1 par rapport à %FE.

Le critère %FE obtenu par la correction de C1 par C2 semble donc permettre de détecter un plus grand nombre de QTL, en réduisant la part des effets résiduels non liés aux traitements étudiés. On peut se demander si ce résultat aurait pu être obtenu avec le critère C1 en augmentant le nombre de répétitions des mesures.

Pour le critère C2, aucun QTL n'a été détecté, quels que soient les traitements toxiques appliqués.

3.4.5 Bilan de résultats de la section 3.4

Nous n'avons pas pu trouver une méthode de mesure de C2 satisfaisante qui permettrait de mieux corriger C1 des effets de variation résiduelle non liés aux facteurs étudiés.

Une très forte corrélation entre les deux critères C1 et %FE a été observée pour une gamme de clones ainsi que pour une famille F1 d'hévéa en réponse à différents traitements toxiques. Pour la classification des traitements selon leurs profils d'agressivité sur une gamme de clones, et pour la classification des clones selon leurs profils de sensibilité, les critères C1 et %FE ont donné à peu près les mêmes résultats.

Cependant il est conseillé de maintenir la correction de C1 par C2 puisque nous avons constaté une variabilité de la capacité des tissus à libérer des électrolytes d'un plant à un autre, au sein d'un même clone. Cette correction sera donc poursuivie, faute d'une meilleure méthode, car elle semble réduire la part d'effets résiduels autres que ceux des traitements étudiés (épaisseur des tissus de la rondelle, ...etc). La correction de C1 par C2 a ainsi permis d'identifier les huit QTL associés au critère C1 ainsi que cinq QTL supplémentaires associés au critère %FE en réponse aux différents traitements toxiques étudiés. Il est également recommandé de prévoir un nombre de répétitions biologiques suffisant pour les mesures, ce qui est une autre façon de réduire la variance des effets estimés, et donc d'améliorer la précision des estimations.

Chapitre 4 - Discussion, Conclusions & Perspectives

4.1 Discussion générale

Nous avons développé une nouvelle méthode de phénotypage indirect, dite « test toxinique », consistant à tester la réponse de clones d'hévéa aux exsudats de *Corynespora* (filtrats de culture ou toxine purifiée) par conductimétrie. Cette méthode vise une efficacité accrue par rapport aux tests utilisés précédemment (Breton et al., 2000). Ici, au lieu de mesurer la surface de nécrose foliaire ou les pertes en eau (flétrissement) induites par le traitement, l'impact des exsudats a été quantifié par la mesure des fuites d'électrolytes, selon une méthode déjà utilisée pour l'étude de stress abiotiques (Herbette et al., 2005; Lutts et al., 1996; Mai et al., 2009). Cette méthode s'est révélée facile, rapide et économe en solutions toxiques, permettant son application à de grands nombres d'échantillons et fournissant de ce fait un critère pouvant être utilisé dans la pratique courante de la sélection sous réserve que l'information produite puisse être mise en relation avec la tolérance des clones d'hévéa à *Corynespora* en conditions de plantation. La présence de deux traitements à blanc et de trois traitements toxiques constitués par des solutions de toxine purifiée Cas1 à trois niveaux de concentration (1, 5, et 10 ng/μL) a permis de vérifier la cohérence du test : on a en effet bien observé une réponse croissante en fonction de la concentration en toxine dans les expériences méthodologiques (Tab 3-1, 3-3, 3-5 et 3-7) et dans les expériences sur une large gamme de clones CF et CI (Tab 3-13 et 3-14). Par ailleurs, une bonne corrélation a été trouvée dans l'expérience CI entre les réponses mesurées par conductimétrie (%FE) et les mesures de surface de nécrose (SN) au niveau des moyennes par clone ou par traitement toxinique. En revanche, la présence de nécroses avec noircissement des nervures est apparue spécifique des traitements CCP, Tox5 et Tox10, et cela a également été observé dans d'autres situations. Le critère SN, par ailleurs assez difficile à mesurer, semble donc moins pertinent que %FE pour estimer de façon comparative les réponses de combinaisons clone x traitement toxinique variées.

Le test toxinique a ainsi permis d'étudier les réponses d'un grand nombre de combinaisons clones x traitements toxiques, et de détecter, pour la première fois sur une famille

biparentale d'hévéa, une série de QTL de sensibilité aux exsudats sécrétés de différents types de souches.

Les résultats présentés dans le chapitre III seront discutés ici en quatre parties concernant : (1) les aspects méthodologiques du test, (2) la validité du test pour caractériser les réponses clonales de l'hévéa à *Corynespora*, (3) la validité du test pour identifier des pathotypes chez *Corynespora* et (4) le déterminisme génétique de la réponse de l'hévéa aux exsudats de *Corynespora*.

4.1.1 Aspects méthodologiques du test

Nous avons effectué un certain nombre de vérifications méthodologiques portant sur quatre facteurs d'influence, notamment le stade foliaire et la durée d'incubation dont nous discutons les résultats ci-après. Nous avons également examiné les données mesurées pour juger de la pertinence de la correction de C1 par C2 conduisant au calcul du critère %FE.

Stade de développement et durée d'incubation

L'influence du stade foliaire a été étudiée uniquement sur le clone très sensible IRCA631. Cette étude a montré que les stades C et D étaient ceux qui permettaient le mieux de différencier des traitements toxiques d'agressivités différentes. Il est apparu trop compliqué de réaliser le test en routine au stade B2, et de plus ce stade se montre tellement sensible qu'il permet également une réponse assez importante aux effets artefactuels des traitements à blanc. A contrario, le stade D+ est apparu peu sensible et ne permettait que des réponses faibles, y compris pour les traitements les plus agressifs. Les feuilles matures, plus rigides, sont probablement moins sensibles aux enzymes hydrolytiques et/ou aux toxines produites par le champignon. Les résultats obtenus pour les stades B2 et D+ sont responsables des interactions stade x traitement mises en évidence par l'analyse de variance, ce qui souligne l'importance d'un prélèvement des folioles à un même stade. Pour la définition d'une procédure standardisée, on propose de réaliser les tests au stade C, comme cela a été fait dans toute la suite de cette recherche. Ce résultat est concordant avec celui d'une étude précédente réalisée par inoculation conidienne (Chee, 1988) et montrant que les folioles d'hévéa étaient très sensibles à l'infection par *Corynespora* jusqu'à quatre semaines après le débourrement. Il pourrait cependant être intéressant de réaliser des études particulières aux deux stades C et D afin d'examiner si les deux stades produisent des

résultats fortement corrélés ou si, dans le cas inverse, on peut préciser grâce au test toxinique la durée de période sensible des clones d'hévéa à *Corynespora*.

Avec une gamme de concentration croissante de la toxine Cas1, on a montré qu'une durée d'incubation de 48 heures générerait les réponses %FE les plus élevées aussi bien pour le clone résistant GT1 que pour le clone sensible PB217. Les réponses sont plus faibles pour une durée d'incubation de 24 h. Au-delà de 48 h, la mesure est moins fiable car la cuticule de la face supérieure, probablement fortement dégradée par l'action de la toxine, laisse échapper une partie des électrolytes dans la boîte d'incubation avant le prélèvement de la rondelle foliaire et son transfert dans le tube où C1 et C2 sont mesurés. Une durée d'incubation de 48 h est donc retenue pour la procédure standardisée du test toxinique.

Sensibilité et répétabilité du test

Le critère %FE mesuré par la méthode conductimétrique s'est révélé plus sensible et précis que la simple mesure des symptômes visuels (SN, en mm²) utilisée dans la première approche du test toxinique présentée par Breton et al. (2000) et qui avait été testée seulement avec la souche CCP. En effet, parmi tous les filtrats de culture de cette étude, seuls CCP, CCI501, CNIG404 (ainsi que la toxine Cas1 purifiée) induisent des symptômes clairement visibles et mesurables après 48h d'incubation, du fait du noircissement des nervures dans la zone nécrosée. Pour les autres filtrats, seule la méthode conductimétrique est apparue applicable pour mesurer les réponses de toutes les combinaisons clone x traitement étudiées.

Un test de flétrissement avait également été proposé pour évaluer l'impact des toxines de *Corynespora* sur feuilles détachée, par la mesure des pertes en eau induites : sur des folioles détachées dont l'extrémité du pétiole est trempée pendant 48h dans la solution toxinique (Cas1 purifiée ou filtrat de culture brut), on mesurait l'intensité du flétrissement foliaire par le ratio du poids sec et du poids frais (Breton et al., 2000; Fernando et al., 2010). Cependant, nous avons trouvé cette méthode moins répétable, probablement du fait de contaminations externes qui sont fréquentes en milieu tropical. De plus, cette méthode est moins économe que notre test toxinique en quantité de toxine ou de filtrat consommée.

La comparaison des expérimentations CF et CI sur une même gamme de 19 clones en serre (Clermont-Ferrand) et en plantation (Côte d'Ivoire), et avec une même gamme de 11 traitements toxiques, a montré une bonne relation entre les deux séries de résultats. Cependant la valeur de %FE dans l'expérience CI était en moyenne deux fois plus

importante que celle obtenue dans l'expérience CF. Cela était dû à une abondance de combinaisons clone x traitement montrant des réponses très faibles dans l'expérience CF. La corrélation entre les moyennes par clone de tous les traitements dans les deux expériences était élevée ($r = 0.76$), et la corrélation entre les moyennes par traitement de tous les clones était encore plus forte ($r = 0.94$). Les deux expériences permettaient donc de classer les clones selon leur sensibilité et les traitements toxiques selon leur agressivité de façon similaire dans les deux expériences. En revanche, les corrélations entre les réponses aux différents traitements pour un même clone, ou entre les réponses des différents clones pour un même traitement, étaient très variables, probablement du fait du faible nombre de couples de données pour chaque situation. Ces corrélations n'étaient parfois pas significatives, notamment pour les clones peu sensibles et pour les traitements peu agressifs présentant des réponses relativement faibles. On peut aussi penser que les lots de filtrats utilisés pour les deux expérimentations n'étaient pas rigoureusement identiques puisqu'ils résultaient de préparations distinctes. Ils pourraient donc varier légèrement dans leur composition et/ou leur concentration en molécules actives.

La répétabilité du test toxique a pu être appréciée également par la comparaison des résultats obtenus sur deux sous-populations de la descendance PB260 x RRIM600 plantés sur deux sites différents : les deux QTL identifiés en g2 et g4, caractérisant la réponse à CCP et Cas1 purifiée, ont été détectés de façon répétée sur les deux sites. Cependant, sur le seul site de SAPH-Toupah, et pour le seul traitement CCP, un QTL supplémentaire (g5-73) a été détecté, qui ne l'avait pas été sur le site de SOGB. Cette différence entre les deux sites pourrait être expliquée par un environnement différent ou par un effet d'échantillonnage. La répétabilité du test entre les deux sites n'a pas été étudiée pour d'autres filtrats que CCP.

Pertinence de la correction de C1 par C2

Nous avons également étudié la pertinence de la correction de la mesure de conductivité C1 par C2 (conductivité après autoclavage de l'échantillon). La première mesure de conductivité C1 rend compte de la quantité d'électrolytes libérés par l'échantillon sous l'impact de la toxine. La deuxième mesure de conductivité de C2 est sensée rendre compte de la quantité maximale d'électrolytes libérable par l'échantillon sous l'effet physique de l'autoclavage. La correction de C1 par C2 (%FE) avait pour objectif de réduire la part de la variabilité de la mesure C1 non liée aux traitements toxiques (structure, biomasse ou état des folioles utilisées). En effet, nous avons observé une variabilité significative de la mesure C2 intra- et

inter-clones, suggérant une variabilité de la biomasse et/ou de la fragilité intrinsèque des tissus (Fig 3.28 et 3.29), d'où l'intérêt d'apporter une correction pour appréhender plus finement l'effet des traitements. Nous avons également observé une forte corrélation positive entre C1 et C2, et la dépendance de C2 aux facteurs étudiés. Il est apparu que la conductivité C2 n'était pas indépendante du traitement toxinique. L'autoclavage seul ne suffirait pas à libérer la totalité des électrolytes, et les traitements toxiques appliqués amplifieraient son action. Nos tentatives pour obtenir des mesures de C2 indépendantes des facteurs étudiés n'ont pas abouti. Des tests ont été faits pour pousser au maximum l'éclatement cellulaire en procédant à un broyage des rondelles foliaires avant l'autoclavage. On a ainsi obtenu des mesures de C2 un peu plus élevées que celles obtenues par simple autoclavage, mais la dépendance de C2 aux facteurs étudiés est restée présente. Il est possible que les traitements toxiques agressifs facilitent la rupture des cellules lors de l'autoclavage et donc la libération d'une quantité d'électrolytes plus importante. Il est aussi possible que l'épaisseur des folioles des clones détermine l'importance des réponses C1 et C2 ; dans ce cas, il faudrait se demander si l'épaisseur des folioles des clones contribue ou non au risque épidémique.

Les résultats obtenus avec %FE sont très peu différents de ceux obtenus avec le critère C1. D'après les résultats obtenus sur une gamme de clones, la classification des traitements d'après le critère %FE n'est pas différente de celle obtenue d'après le critère C1 (Fig 3.33). La classification des clones selon ces deux critères n'est pas différente pour les clones extrêmes (les plus sensibles et les plus résistants), mais elle est légèrement modifiée pour les clones intermédiaires. En revanche, sur la descendance, on a détecté plus de QTL associés à %FE que de QTLs associés à C1 (Tab 3-44). Cela est possible du fait que les LOD scores obtenus sont généralement proches du seuil de signification, ce qui est dû à de légère différence entre les LOD scores obtenus pour les deux critères. La correction de C1 par C2 semble donc augmenter les valeurs de LOD score, permettant de détecter des QTLs supplémentaires. Il semblerait que les nouveaux QTL détectés grâce à la correction soient tous associés à des filtrats de type A4/Cas0 (si l'on exclue les cas particuliers de CCP* et CCI405). Le seul filtrat A4/Cas0 ayant permis de détecter des QTL avec C1 est CIND3 (les deux QTL identifiés dans ce cas sont spécifiques à ce filtrat). Aucun QTL n'a été identifié avec C1 uniquement. Donc les deux critères C1 et %FE sont utilisables pour le test toxinique. Leur choix dépend de l'objectif de recherche et du contexte de travail. Pour l'objectif de sélection précoce de clones tolérants, l'utilisation de C1 seul permettrait, à

moyens égaux, d'étudier un plus grand nombre de combinaisons clone x traitement avec un plus grand nombre de répétitions et donc d'obtenir des résultats plus précis. Dans un objectif d'étude du déterminisme génétique de la sensibilité aux exsudats de *Corynespora*, le critère %FE est plus précis. Le principal problème posé par le calcul de %FE par rapport à C1 est lié aux contraintes de manipulation imposées par la mesure de C2 (équipement nécessaire pour l'autoclavage, temps d'attente et de mesure supplémentaires). Au-delà de ces considérations, une question reste posée concernant la valeur prédictive du test toxinique pour estimer le risque épidémique des clones d'hévéa vis-à-vis de la maladie CLF dans les conditions naturelles des plantations.

4.1.2 Sensibilité des clones d'hévéa mesurée par le test toxinique

4.1.2.1 Valeur prédictive du test toxinique pour la réponse des clones en inoculation contrôlée

Pour huit clones de sensibilités variées (IRCA631, PB260, IRCA18, PB217, RRIC100, RRIM600, GT1 et IRCA41) et pour chacun des deux filtrats agressifs (CCP et CCI13), nous avons trouvé deux corrélations positives importantes ($r = 0.96$ pour CCP et $r = 0.84$ pour CCI13) entre les réponses %FE des huit clones au test toxinique et les réponses SN à des inoculations de spores sur feuilles détachées. Dans une expérience précédente utilisant le test de flétrissement foliaire, une bonne corrélation avait également été trouvée entre la sensibilité au filtrat et la sensibilité au champignon de la souche correspondante (Breton et al., 2000). Dans ce cas, le test avait été appliqué à un grand nombre de clones d'hévéa (51) mais avec un seul isolat (CCP). Nous confirmons dans cette étude, avec deux souches virulentes de types différents (respectivement C/Cas1 et A4/Cas0), la capacité du test toxinique à prédire la sensibilité au champignon lui-même, du moins en conditions contrôlées sur feuilles détachées et sur des cinétiques de réponse assez courtes (au maximum quatre jours après traitement). Très récemment, le test d'inoculation a été répété avec les mêmes souches (CCP et CCI13) sur les mêmes huit clones, mais cette fois-ci sur feuilles non détachées de plantes en pots, dans les conditions expérimentales homogènes d'un phytotron (Lorient, 2016). Les résultats obtenus étaient bien corrélés avec ceux obtenus sur feuilles détachées au cours de cette thèse. En conclusion, une bonne corrélation a été observée entre les trois méthodes de phénotypage, à savoir le test toxinique sur feuilles détachées, l'inoculation de spores sur feuilles détachées et l'inoculation sur feuilles non détachées, du moins pour les huit clones et les deux souches de *Corynespora* (CCP et CCI13) testés. Il est évident que le test toxinique est une méthode beaucoup plus facile et rapide à mettre en

œuvre que le test d'inoculation. Le test toxinique peut être appliqué à de grands nombres d'échantillons, comme cela a été démontré par les mesures faites sur une grande population pour la détection de QTL. La méthode d'inoculation sur feuilles non détachées des plantes en pots, nécessitant un travail en phytotron, est particulièrement coûteuse en moyens matériels et en temps de travail. De plus, les méthodes d'inoculation sont limitées par l'interdiction d'introduire de nouvelles souches d'un pathogène comme *Corynespora* sur les sites de plantation d'hévéa. Il sera cependant intéressant de poursuivre la comparaison entre les méthodes afin de chercher à identifier quelles informations supplémentaires pourraient être apportées par des expériences d'inoculation venant en complément des expériences de test toxinique sur une gamme de combinaisons restreinte, par exemple pour estimer les durées de période de sensibilité des feuilles à la maladie CLF pour différents clones.

4.1.2.2 Valeur prédictive du test pour la sensibilité des clones en inoculation naturelle

Le test toxinique produit des estimations quantifiées et répétables des réponses des clones à différents traitements toxiques. Ces estimations sont obtenues dans des conditions artificialisées et contrôlées qui sont très éloignées du contexte des épidémies de *Corynespora* dans les plantations d'hévéa. On doit donc chercher à préciser la relation entre ces estimations et la sensibilité des clones dans les plantations, ou encore le risque épidémique présenté par chaque clone. Bien que les caractéristiques épidémiologiques de *Corynespora* soient très peu connues, il semble bien que les épidémies soient déclenchées localement par un seul clone ou par un petit nombre de clones récemment développés sur des surfaces assez importantes. Le principal enjeu serait donc d'identifier le plus tôt possible les clones comportant un risque épidémique. Parmi les clones étudiés dans cette recherche, seuls quelques-uns sont cultivés de façon importante et sont bien connus pour leur comportement lors d'épidémies. Nous les examinons ci-après.

Expérience portant sur huit clones

Concernant l'expérience utilisant huit clones pour la comparaison entre le test toxinique et l'inoculation de spores, GT1 et IRCA41 sont bien considérés comme des clones tolérants à *Corynespora* dans les plantations. A notre connaissance, ils n'ont jamais été affectés par une épidémie. Ceci est confirmé par le test toxinique et par le test d'inoculation pour les deux souches utilisées (CCP et CCI13).

Le clone RRIM600 est apparu peu sensible dans les tests avec le traitement CCP. Ce clone a été déclaré assez sensible au Ghana, et même très sensible en Malaisie et en Indonésie, mais les informations dont nous disposons ne sont pas étayées par des résultats précis. Dans le sud de la Thaïlande où ce clone est prédominant sur des surfaces très importantes, nous n'avons pas connaissance d'épidémies importantes. On peut donc considérer que l'information produite par le test toxinique, suggérant une faible sensibilité, représente bien la situation du clone RRIM600. Avec la souche CCI13 le test toxinique situe RRIM600 au voisinage des clones sensibles PB260, IRCA18 et PB217, mais bien en deçà du niveau de réponse du clone IRCA631.

Le test toxinique avec le traitement CCP suggère une forte sensibilité des clones IRCA631, PB260, IRCA18 et PB217. Cette information est conforme au comportement des trois clones IRCA631, PB260 et IRCA18 porteurs d'un risque épidémique important. Concernant le clone PB217, sa sensibilité en plantation est avérée mais plus faible que celle des trois clones cités. On peut penser que le clone PB217 subit la pression d'un inoculum développé par une épidémie, mais qu'il ne génère pas par lui-même une croissance de l'inoculum naturel. En effet, le clone PB217, l'un des plus représentés dans les plantations d'Afrique de l'ouest, n'a jamais été jugé responsable d'une épidémie. Lors des épidémies dues à IRCA18, l'éradication ou le traitement phytosanitaire du seul clone IRCA18 a suffi à rétablir un bon état sanitaire des plantations.

Le clone RRIC100 présente une réponse moyenne au test toxinique avec CCP et une réponse élevée avec CCI13. Or ce clone est toujours apparu très résistant à *Corynespora* en situation épidémique et il est même considéré comme l'un des rares clones utilisables dans les régions les plus affectées par cette maladie. Cette différence entre les tests en conditions contrôlées et le comportement en champ de RRIC100 avait également été notée dans des recherches antérieures. Il reste donc à comprendre les causes de cette différence d'appréciation de ce clone d'une part en conditions contrôlées et d'autre part en situation épidémique.

Expériences CF et CI

Le Tab 3-27 présente un classement des réponses moyennes de 19 clones à 18 traitements toxiques (traitements à blanc inclus) sur le regroupement des données des deux expériences CF et CI. Concernant les clones dont le comportement en situation épidémique est connu, on observe que le clone résistant IRCA41 produit bien des réponses faibles aux

tests toxiques, ce qui est aussi le cas pour le clone RRIM600. Les clones connus pour leur risque épidémique PB260 et IRCA631 présentent bien des réponses élevées aux tests toxiques. En revanche, le clone résistant GT1 présente dans ces expériences une réponse moyenne, équivalente à celle de PB217, et surtout le clone IRCA18, jugé responsable des épidémies observées depuis l'an 2000 dans quatre pays d'Afrique de l'ouest, présente une réponse modérée aux tests toxiques. On notera cependant que ce clone n'a pas été testé avec l'ensemble des filtrats et en particulier avec les filtrats des souches isolées récemment en Afrique de l'Ouest, qui pourraient être plus représentatives de l'inoculum naturel rencontré actuellement en Côte d'Ivoire.

Expérience sur la descendance

En ce qui concerne la descendance et ses deux populations présentes sur les sites de Toupah et de la SOGB, nous avons cherché à comparer les réponses révélées par les tests toxiques avec les résultats des notations de symptômes foliaires effectuées *in situ*. Ces notations rendaient compte de l'intensité des attaques foliaires observées sur les arbres des deux populations, mais on ne peut assurer que ces attaques étaient seulement dues à *Corynespora*.

Les notations de symptômes foliaires effectuées en septembre 2015 sur le site de Toupah ont permis de détecter le QTL g2-26 identifié au moyen des tests toxiques avec la cassiicoline Cas1 et trois filtrats de type C/Cas1. Sans que ce soit une véritable preuve, cette bonne concordance semble indiquer d'une part que l'inoculum naturel présent dans l'essai à cette date comportait des souches de *Corynespora* de type C/Cas1, et d'autre part que le test toxique était dans ce cas prédictif de la sensibilité à *Corynespora* observée au champ.

En revanche, un QTL spécifique g18-87 a été détecté en novembre 2014 sur la base des notations d'intensité d'attaque foliaire à la SOGB. Ce QTL n'avait été détecté avec aucun des traitements toxiques étudiés sur la descendance. On ne peut donc tirer aucune conclusion de ce résultat. Il est possible que les attaques de feuilles observées dans ce cas ne soient pas dues à *Corynespora*. Cette situation souligne l'intérêt qu'on aurait à disposer d'une méthode simple de diagnostic de la nature des attaques fongiques qui soit plus fiable que la simple reconnaissance visuelle de symptômes.

Les différences entre les résultats du test toxique et les risques épidémiques connus pourraient être expliquées par le fait que l'inoculum naturel est un mélange complexe impliquant plusieurs espèces de champignons pouvant avoir des effets cumulés ou

interactifs. Il est possible que les filtrats testés ne représentent pas les types de souches de *Corynespora* présentes dans le milieu naturel. Il est donc important de caractériser l'inoculum naturel sur les plantations participant à cette étude et d'étudier son évolution au cours du temps, en fonction de différents paramètres épidémiologiques.

Il convient de poursuivre les études afin de comprendre comment mettre en relation les réponses au test toxinique avec le risque épidémique.

4.1.3 *Le test toxinique permet-il d'identifier des pathotypes de Corynespora ?*

Dans notre étude, au moins trois clusters principaux de filtrats ont été identifiés en fonction de leur toxicité sur deux gammes de clones, à Clermont-Ferrand (Fig 3.15) et en Côte d'Ivoire (Fig 3.17), ainsi que sur les populations Pop1 et Pop2 de la descendance F1 de la famille PB260 x RRIM600 (Fig 3.25 et 3.26).

Un pathotype est un isolat qui se distingue par son pouvoir pathogène (virulence et agressivité) (Plank, 1968; Watson, 1970). Nous nous sommes demandé si ces clusters regroupant les traitements toxiques pouvaient correspondre à différents pathotypes identifiables d'après leur type (groupe génétique et classe toxinique) selon la classification de Déon et al (2014). L'un des clusters identifiés sur les deux gammes de clones (Tr1, Fig 3.15 et 3.17) correspond au filtrat CCP et à la cassiicoline Cas1 purifiée aux concentrations les plus fortes (Tox5 et Tox10). Le cluster Tr2 est constitué exclusivement de filtrats A4/Cas0 (Fig 3.15) ou de filtrats A4/Cas0 et C/Cas1 (Fig 3.17). Le troisième cluster est constitué de filtrats de types variés. Ci-dessous, nous discutons plus en détail le cas des filtrats de type C/Cas1 et A4/Cas0.

4.1.3.1 *Le type C/Cas1*

Le fait que le filtrat CCP et la cassiicoline Cas1 purifiée aux concentrations les plus fortes (Tox5 et Tox10) soient groupés dans un même cluster Tr1 suggère que la cassiicoline est bien le déterminant principal de la toxicité du filtrat CCP. Ceci a été confirmé lors du phénotypage de la famille PB260 x RRIM600. En effet, les deux QTL g2-26 et g4-95, ont été révélés avec le filtrat CCP et avec la toxine purifiée (Tab 3-33 et Fig 3.27), et pas avec d'autres traitements toxiques. Cependant, la cassiicoline Cas1 ne serait pas le seul facteur de toxicité du filtrat CCP puisqu'un petit QTL supplémentaire (en g5-73) a été révélé avec CCP uniquement, sur le site de la SOGB. L'effet du petit QTL pourrait être masqué par celui

de la cassiicoline dans certaines conditions (environnement différent, effet d'échantillonnage).

Les deux QTL révélés par la toxine Cas1 ont également été détectés avec les filtrats de deux nouvelles souches d'Afrique de l'Ouest (CCI501 et CNIG404) isolées au cours de cette thèse, de même type que CCP (C/Cas1) (Tab 3-33). Ceci suggère que les filtrats CCP, CCI501 et CNIG404 partagent des facteurs de sensibilité communs, dont l'un au moins serait la cassiicoline Cas1. Cependant, dans l'expérience CI de Côte d'Ivoire portant sur 20 clones, les filtrats CCI501 et CNIG404 n'étaient pas positionnés dans le même cluster que CCP. Ceci pourrait être dû à la présence d'autres effecteurs que Cas1, qui pourraient modifier leur profil de réponse. Pour vérifier le rôle de Cas1 dans la toxicité du filtrat de ces nouveaux isolats, il faudrait étudier l'expression du gène *Cas1*, isoler la toxine par extraction biochimique, et/ou supprimer le gène *Cas1* par mutagenèse afin d'étudier l'agressivité des souches mutées, comme dans le cas du mutant CCP*

CCP* est la souche CCP dont le gène *Cas1* a été supprimé par recombinaison homologue (Déon et al, non publié). Le filtrat CCP* testé sur une gamme de clones semblait en moyenne moins agressif que le filtrat CCP natif ou que Cas1 purifiée mais il montrait néanmoins une agressivité assez élevée (Tab 3-23). Ce résultat est analogue avec celui qui a été obtenu chez le blé par Tan et al., (2015) : la souche SN15 de *Parastagonospora nodorum*, agent pathogène de la maladie SNB (Septoria Nodorum Blotch) chez le blé, avait été mutée en supprimant trois effecteurs, SnToxA, SnTox1 et SnTox3 ; mais son filtrat de culture restait agressif quoique moins que celui de la souche native.

Le profil de réponse du filtrat CCP* ressemble à celui des filtrats CCI403 et CCI434, de type A4/Cas0 (Fig 3.17 et 3.26). Pour ce filtrat, on n'a pas détecté les deux QTL associés à Cas1 (g2-26, g4-95) ni le QTL additionnel g5-73 associé au filtrat natif CCP, ce qui paraît logique, mais on a révélé deux autres QTL : g3-11 commun avec CCI403 (type A4/Cas0) et g9-62 commun avec CCI434 (type A4/Cas0) et CCI405 (type A4/Cas1). Cela suggère que la souche CCP possède d'autres effecteurs que Cas1 qui pourraient être également présents chez des souches de type A4/Cas1 et A4/Cas0. Mais ces facteurs de toxicité pourraient être masqués par l'effecteur principal Cas1 dont l'action serait plus discriminante entre les génotypes de la descendance, provoquant la détection de QTL spécifiques à cet effecteur.

Dans le cluster Tr2 (Fig 3.17), la souche CCAM3, de type C/Cas1, n'est pas groupée avec les deux autres souches de même type (CCI501 et CNIG404) mais localisée dans un sous-cluster de souches A4/Cas0 (CCI6, CSRI5 et CCI13). De plus, dans l'étude de la descendance, le filtrat CCAM3 n'a révélé aucun QTL commun avec les filtrats de type C/Cas1 (Tab 3-33). En revanche, il a révélé un QTL spécifique (g12-53) et un autre commun avec deux souches de deux types différents (g13-102 pour les filtrats CSRI5 et CSB16). Il a été montré antérieurement que le gène *Cas1* était strictement identique dans les deux souches CCP et CCAM3 (sans variation allélique), mais plus faiblement exprimé dans la souche CCAM3 comparativement à CCP, en accord avec un niveau d'agressivité plus faible pour CCAM3 (Déon et al., 2012b, 2014). La cassiicoline Cas1 ne serait donc pas un effecteur important de cette souche.

Dans le cluster Tr3 (Fig 3.17) on trouve un autre filtrat d'une souche portant le gène de cassiicoline *Cas1*. Il s'agit de CCI405, de type A4/Cas1. Cette souche a été isolée sur la plantation de Bongo en Côte d'Ivoire en 2014. C'est la première fois que le gène *Cas1* est identifié dans une souche de groupe génétique autre que le groupe C. Le filtrat de CCI405 était très peu agressif dans l'expérience CI (Tab 3-23). Ce filtrat est regroupé avec d'autres filtrats de types variés, également peu agressifs. Comme dans le cas de CCAM3 discuté plus haut, il est possible que le gène *Cas1* ne soit pas ou peu exprimé dans ce cas, ce qui expliquerait que cette souche se comporte différemment des souches de classe toxinique Cas1 ; cela reste à vérifier.

4.1.3.2 Les autres types

Les filtrats de type A4/Cas0 sont assez divers en termes de toxicité puisqu'ils sont répartis dans les deux clusters principaux Tr2 et Tr3, et dans au moins quatre sous-clusters (Fig 3.15 et 3.17). Dans l'expérience sur la descendance, les filtrats A4/Cas0 apparaissent aussi dans deux clusters (Fig 3.25 et 3.26) et révèlent huit QTL différents (avec zéro à trois QTL par filtrat) dont certains communs à deux ou trois filtrats (Tab 3-33). Par exemple, le QTL g4-32 est commun à trois filtrats agressifs classés dans le même sous-cluster (Fig 3.25). Le QTL g6-26 est commun à trois filtrats également dans le même sous-cluster. Par contre, le filtrat peu agressif CLN16 (type A4/Cas0) n'a révélé aucun QTL. Il faut rappeler que la classe toxinique Cas0 désigne les souches dépourvues de gène de cassiicoline, dont les effecteurs sont encore inconnus. Il est donc probable qu'il existe une diversité importante au sein du

groupe phylogénétique A4 en ce qui concerne la composition en molécules impliquées dans la toxicité du filtrat, ce qui expliquerait les différences concernant les QTL détectés.

Les trois filtrats de type B4/Cas5 (TSB1, CSB16 et CCI416) sont groupés dans le même cluster (Tr3), en deux sous-clusters (Fig 3.17). Dans l'expérience sur la descendance, les deux filtrats de type B4/Cas5 testés (CSB16 et TSB1) ont également les mêmes profils de toxicité (Fig 3.25). Cependant, ils ne révèlent pas de QTL commun.

Le filtrat CTHA3 de type F1/Cas0, faiblement agressif, n'a permis aucune détection de QTL.

Alors que certains QTL semblent spécifiquement associés à un type de filtrat, probablement du fait de facteurs de toxicité communs, d'autres sont révélés par des filtrats de types différents. Le QTL g13-102, en particulier, a été révélé par trois filtrats de trois types différents (C/Cas1, A4/Cas0 et B4/Cas5). Ces trois filtrats pourraient donc avoir un effecteur commun. Selon une autre hypothèse, ce QTL pourrait être associé à des mécanismes de défense très généraux, non spécifiques d'une espèce fongique ou d'une souche en particulier.

En résumé, le test toxique a effectivement permis de différencier des groupes de filtrats d'après leurs profils de toxicité sur une gamme de clones ou sur la famille PB260 x RRIM600. Parmi les filtrats les plus agressifs, il semble possible de différencier des « pathotypes », en particulier les souches de types C/Cas1 qui se différencient nettement des autres et pour lesquelles la cassiicoline Cas1 semble effectivement jouer un rôle majeur en conférant au filtrat une plus grande toxicité. Cependant, la définition des pathotypes est compliquée par le fait que, même si le gène codant pour un effecteur (par exemple la cassiicoline) est présent, il peut être exprimé à des niveaux différents, voire pas du tout. Et par ailleurs, d'autres facteurs de toxicité peuvent être communs à plusieurs types de souches. En particulier, cette étude a montré qu'il existe probablement des facteurs de toxicité communs entre les souches de type C/Cas1 et les souches de type A4/Cas0.

L'existence de « races » parmi les souches de *Corynespora* avait été proposée dans des études antérieures. Ainsi, dans deux études de la pathogénicité de souches collectées en Malaisie (Nghia et al., 2008) ou au Vietnam (Hieu et al., 2014), deux races différentes avaient été mises en évidence en inoculant ces souches locales, de deux groupes génétiques différents identifiés par marqueurs ITS et ISSR, sur feuilles détachées et/ou sur feuilles *in vivo* de quelques clones d'hévéa. Des travaux antérieurs (Déon et al., 2014 ; Dixon et al., 2009) ont montré que la diversité génétique de *C. cassiicola* était en fait très importante mais que la

définition de profils de virulence était compliquée. Les inoculations réalisées par Marine Déon avec quelques souches représentatives des différents types sur seulement deux clones d'hévéa n'avaient pas permis d'établir une relation claire entre les types de souches et les profils de virulence. Le test toxinique développé au cours de cette thèse est donc un outil intéressant pour estimer les niveaux de toxicité des filtrats, et indirectement l'agressivité des souches correspondantes.

4.1.4 Déterminisme génétique de la réponse de l'hévéa aux exsudats de *Corynespora*

4.1.4.1 La cartographie génétique à l'aide des marqueurs SSR

Cette recherche présente pour la première fois une carte génétique d'une famille F1 d'hévéa construite exclusivement avec des marqueurs SSR à la suite d'un génotypage par la technique d'électrophorèse capillaire. Les longueurs totales des cartes obtenues (2005 cM à 2036 cM) sont voisines de celles qui avaient été obtenues précédemment avec les mêmes méthodes et paramètres sur le logiciel JoinMap (algorithme de cartographie par régression linéaire et distance de Kosambi), par Lespinasse *et al.*, (2000b) sur la famille PB260 x RO38 (2144 cM pour 106 individus et 717 marqueurs dont 301 RFLPs, 388 AFLPs, 18 SSRs et 10 isozymes), par Rattanawong *et al.*, (2008) sur la famille RRIM600 x PB217 (2075 cM pour 196 individus et 427 marqueurs dont 243 SSRs et 184 AFLP), ou encore par Le Guen *et al.*, (2011) sur la famille PB260 x MDF180 (2441 cM pour 351 individus et 383 marqueurs dont 195 SSR, 187 AFLP et 1 STS). Dans une étude sur les aspects statistiques de la cartographie des marqueurs moléculaire, (Lorieux, 1994) a constaté que les types de population en ségrégation (backcross, F2, lignées recombinantes, haploïdes doublés), le nombre d'individus et les types de marqueurs (dominant ou co-dominant) pouvaient influencer la précision de l'estimation des fréquences de recombinaison dont dépend la distance génétique.

Nous avons vérifié, pour chacun des 18 groupes de liaison, la bonne colinéarité des marqueurs communs aux trois cartes obtenues pour les populations Pop1, Pop2 et le regroupement des deux populations (Annexe 4). La comparaison avec les cartes génétiques de l'hévéa déjà publiées (Le Guen *et al.*, 2011; Lespinasse *et al.*, 2000b; Rattanawong, 2012) a confirmé la cohérence des trois cartes obtenues (résultat non présenté ici). La carte obtenue par regroupement des deux populations, étant en principe la plus précise, a été retenue pour la détection de QTL sur chacun des deux sites correspondant aux populations Pop1 et Pop2 (SOGB et SAPH-Toupah).

Concernant les grands segments sans marqueur présents sur la carte génétique, on peut selon une première hypothèse, considérer qu'ils correspondent à des régions à haute fréquence de recombinaison où les distances génétiques surestiment les distances physiques. Selon une seconde hypothèse, on peut supposer que ces régions soient naturellement pauvres en marqueurs microsatellites. Selon une troisième hypothèse (plus probable), des marqueurs polymorphes existeraient dans ces régions mais ne feraient pas partie de la collection disponible actuellement au Cirad. Pour réaliser la carte génétique de la famille RRIM600 x PB217 (Rattanawong, 2012), on avait ajouté 184 marqueurs AFLP à 243 marqueurs SSR, ce qui avait permis de n'avoir plus que six segments de plus de 20 cM. D'autres types de marqueurs, tels que les SNP, pourraient être envisagés pour améliorer la couverture du génome par les marqueurs. Cependant, l'utilisation d'un seul type de marquage moléculaire (SSR dans notre cas) a considérablement facilité la rapidité d'exécution du génotypage avec un grand effectif d'individus. Si l'on voulait améliorer la couverture du génome par l'emploi des seuls marqueurs microsatellites, afin de maintenir une bonne productivité du travail de génotypage, on devrait donc chercher à enrichir la collection actuelle de ces marqueurs.

4.1.4.2 Déterminisme génétique de la réponse de la famille F1 aux exsudats de *Corynespora* et à l'inoculum naturel

Cette étude présente pour la première fois l'identification de QTL associés à la réponse d'*H. brasiliensis* aux exsudats sécrétés par *Corynespora cassiicola*. Au total, treize QTL localisés sur 10 chromosomes différents ont été détectés pour 15 traitements toxiques de *Corynespora* d'origines géographiques et de types génétiques différents, avec jusqu'à trois QTL par traitement. Les pourcentages d'explication de la variation phénotypique (R^2) sont tous compris entre 10 et 20 %, ce qui indique des effets modérés de ces QTLs. On n'a donc pas détecté de QTL à effet majeur, et les QTL détectés représentent, pour chaque traitement toxique étudié, les *locus* ayant les effets les plus importants parmi l'ensemble des effets liés à l'expression génétique en réponse aux traitements appliqués. La variabilité observée de la réponse de l'hévéa vis-à-vis des exsudats de *Corynespora* serait donc générée de façon polygénique par un ensemble de gènes à effets mineurs, du moins pour la famille et les traitements étudiés.

Ce premier résultat obtenu chez l'hévéa est en partie comparable avec des études récentes chez l'orge qui ont révélé des QTL multiples associés à la sensibilité au champignon nécrotrophe *Pyrenophora teres* f. sp (Liu et al., 2015). Au moins dix régions génomiques de l'orge sont associées à dix isolats différents de *Pyrenophora* avec deux à trois QTL détectés

par isolat, et deux à trois QTL communs entre les isolats. Le cumul des effets de ces facteurs génétiques expliquait de 1 à 73 % de la variation phénotypique. Il y avait cependant dans ce cas un QTL, à effet important, commun à cinq isolats différents, ce QTL expliquait de 21 à 34 % de la variation phénotypique.

Chez le blé, neuf gènes *Snn* de sensibilité aux effecteurs nécrotrophiques SnTox sécrétés par le champignon *Parastagonospora nodorum* ont été identifiés : *Tsn1*–SnTox A (Faris and Friesen, 2009; Faris et al., 2010; Friesen et al., 2006, 2009; Liu et al., 2006; Zhang et al., 2009), *Snn1*–SnTox1 (Liu et al., 2012, 2004a, 2004b; Reddy et al., 2008), *Snn2*–SnTox2 (Friesen et al., 2007, 2009; Zhang et al., 2009), *Snn3*–B1–SnTox3 (Friesen et al., 2008; Liu et al., 2009), *Snn3*–D1–SnTox3 (Zhang et al., 2011), *Snn4*–SnTox4 (Abeysekara et al., 2009), *Snn5*–SnTox5 (Friesen and Faris, 2012), *Snn6*–SnTox6 (Gao et al., 2015) et *Snn7*–SnTox7 (Shi et al., 2015). Ces interactions gène-pour-gène expliquaient chacune de 18 à 95 % de la variation phénotypique. Certaines de ces interactions contribueraient donc partiellement à construire une tolérance polygénique en principe plus durable que des résistances de type monogénique. Tous ces effecteurs nécrotrophiques SnTox sont des petites protéines de taille variant entre 10 et 30 kDa.

Dans le cas de *Corynespora*, on pourrait avoir une situation similaire. Selon les souches et les hôtes, certains effecteurs pourraient générer un mécanisme de sensibilité/tolérance de type polygénique (comme dans le cas de notre étude), tandis que d'autres généreraient une résistance de type monogénique, comme dans le cas décrit chez le concombre (Wen et al., 2015). Dans l'étude sur le concombre, le facteur de sensibilité/résistance impliqué pourrait être un gène de résistance de type CC-NB-ARC. L'effecteur impliqué n'est pas caractérisé.

Les filtrats de *Corynespora* contiennent probablement un mélange de molécules diverses issues du champignon et susceptibles d'interagir avec des cibles moléculaires variées chez l'hévéa, contribuant ainsi au déterminisme polygénique de la sensibilité. De très nombreuses études ont montré l'existence de molécules sécrétées par les champignons et jouant un rôle dans l'interaction avec les plantes. Nous n'en citerons que quelques exemples. L'éliciteur protéique SCFE1 dans le filtrat de culture du champignon *Sclerotinia sclerotiorum* joue un rôle de PAMP (« Pathogen Associated Molecular Pattern ») capable de déclencher l'immunité basale ou PTI (« PAMP-triggered immunity ») chez *Arabidopsis* (Zhang et al., 2013). Des phytotoxines (Girish et al., 2009) ou des effecteurs protéiques de virulence (Friesen and Faris, 2012; Tan et al., 2010) ont également été extraits à partir de filtrats de

culture fongiques. Dans une étude récente sur l'interaction entre *Zymoseptoria tritici* et le blé (Kettles and Kanyuka, 2016), on a montré le rôle de la chitine en tant que PAMP ainsi que l'existence d'effecteurs nécrotrophiques protéiques. La chitine est reconnue par le récepteur kinase CERK1 ce qui déclenche la PTI chez le blé. L'effecteur protéique Mg3LysM associé à la chitine supprime l'immunité basale chez le blé. Enfin, deux effecteurs nécrotrophiques protéiques ZtNIP1 et ZtNIP2 induisent la mort des cellules de l'hôte.

Une estimation des effets alléliques des QTL aux positions des marqueurs les plus proches a montré une diversité de situations (Tab 3-34), avec des QTL générés par une différence entre les effets des deux allèles maternels (g4-95), d'autres dus à une différence entre les effets des deux allèles paternels (g14-64, g16-77), d'autres dus au cumul de ces deux types d'effets principaux (g2-26, g6-26, g16-11, g18-87) et enfin des QTL dus à l'interaction entre allèles maternels et paternels (g4-32, g13-102). Lorsque un QTL est détecté pour plusieurs traitements, on observe que les effets alléliques restent à peu près les mêmes quel que soit le traitement, ce qui indique donc bien un effet d'expression génétique propre à chaque QTL détecté en réponse aux traitements qui ont permis sa détection. Ces observations permettent de souligner le fait que les QTL détectés dépendent non seulement des traitements appliqués mais aussi de la constitution allélique des gènes correspondant aux QTL chez chacun des deux parents de la famille étudiée. On peut supposer que des résultats très différents auraient pu être obtenus avec les mêmes traitements toxiques pour une autre famille d'hévéa.

Deux QTL identifiés dans cette étude ont été localisés dans les mêmes régions génomiques que deux QTL précédemment détectés pour la résistance au champignon pathogène *Microcyclus ulei*. Le QTL g2-26 détecté pour les exsudats Tox5, CCP, CCI501 et CNIG404 et pour la notation de l'état sanitaire des feuilles dans l'essai Pop2 de Toupah est localisé dans la même région génomique (entre les deux marqueurs A2734 et T2140) que le QTL *M2fx* associé à la résistance à *Microcyclus ulei* et détecté dans la famille PB260 x Fx2784 (Le Guen et al., 2013) sur le groupe de liaison g2. Le QTL g13-102 détecté pour CCAM3, CSB16 et CSRI5 dans la population Pop1 (SOGB) est localisé dans la même région génomique (à proximité du marqueur EM36-13-14) que le QTL majeur *M13-Ibn* détecté pour *M. ulei* dans la famille PB260 x RO38 (Le Guen et al., 2003). Cependant, du fait de la précision assez limitée de la localisation des QTL sur les cartes génétiques (quelques centiMorgans correspondant à plusieurs mégabases sur la carte physique du génome de l'hévéa), on ne sait pas si ces facteurs génétiques co-localisés, impliqués dans la réponse à

deux pathogènes très différents, sont communs ou distincts. Il est connu que les gènes de résistance impliqués dans les interactions biotiques sont souvent organisés en clusters dans le génome (Chen et al., 2015; Kim et al., 2012; Perazzolli et al., 2014; Yang et al., 2013). Un QTL commun peut donc recouvrir plusieurs gènes *R*, chacun interagissant avec des effecteurs spécifiques de différents pathogènes. De plus, le fait que ces QTL en co-localisation aient été détectés pour des familles différentes affaiblit l'hypothèse d'un facteur génétique commun.

Nous n'avons trouvé aucun QTL commun à tous les exsudats. Cela suggère qu'aucun QTL n'est directement associé aux motifs PAMPs (« Pathogen-Associated Molecular Patterns ») qui sont en général très conservés pour les pathogènes d'une même espèce. Inversement, les différents QTL détectés selon les filtrats, suggèrent l'implication d'effecteurs (ou de combinaisons d'effecteurs) propres à chaque type d'isolat.

Un résultat non présenté dans cette étude montrait que la cassiicoline purifiée n'induit pas de réponse si l'on n'a pas gratté préalablement l'épiderme foliaire. Cela suggère qu'elle n'est pas capable à elle seule de pénétrer dans les cellules. On peut donc supposer que l'action préalable d'autres molécules produites par le mycélium du champignon en développement (enzymes hydrolytiques, ...) est nécessaire pour lui permettre de pénétrer dans la foliole et d'atteindre ses cibles, soit au niveau de la membrane plasmique (s'il s'agit d'un récepteur), soit de manière intracellulaire. Dans notre test, le grattage est nécessaire pour permettre aux effecteurs de pénétrer dans la cellule hôte. Par ailleurs, le grattage pourrait générer des éliciteurs endogènes (DAMPs) résultant de la blessure et capables de déclencher des réactions de défense basale (« DAMP-triggered immunity»). On remarquera que, dans notre test, le grattage n'a pas d'effet significatif sur la variabilité de la réponse puisque les réponses sont très faibles et qu'aucun QTL n'a été détecté pour les traitements à blanc (CZ ou Tox0).

En référence au modèle de l'immunité chez les plantes proposé par Tsuda and Katagiri (2010) et Dangl (2013), le modèle que nous proposons pour expliquer la sensibilité/tolérance aux exsudats de *Corynespora* chez l'hévéa pourrait être le suivant : des signaux moléculaires d'origine fongique (PAMP) présents dans les filtrats et/ou des signaux d'origine végétale (DAMP) générés par le grattage de la cuticule pourraient être perçus par les cellules végétales *via* des récepteurs extracellulaires de type PRR (« Pattern Recognition Receptors »), ce qui activerait les défenses basales de la plante (PTI ou DTI). Dans un

second temps, des toxines ou effecteurs nécrotrophiques sécrétés par le champignon (tels que la cassiicoline) pourraient intervenir, soit au niveau apoplastique pour bloquer la perception des signaux PAMP et DAMP, soit de manière intracellulaire pour interférer avec les défenses basales. Pour un effecteur donné (par exemple la cassiicoline purifiée), la variabilité de réponse des clones à cet effecteur peut être expliquée par la présence/absence d'une cible moléculaire de cet effecteur (récepteur ou autre). Elle peut être expliquée aussi par la variabilité des mécanismes de détoxification ou de « réparation », postérieurs à l'étape d'interaction avec la cible initiale. Pour un clone donné, la variabilité de réponse vis à vis de filtrats différents peut être expliquée par la variabilité de la composition en exsudats de ces filtrats.

Dans notre étude, le phénotypage de la famille F1 PB260 x RRIM600 n'a révélé aucun QTL majeur (à effet R^2 important) quels que soient les exsudats de *Corynespora*, et même avec la toxine Cas1 purifiée. On ne serait donc pas dans une situation d'ETS (« Effector-Triggered Susceptibility ») où l'interaction de l'effecteur avec le produit d'un gène de résistance *R* entraînerait une mort cellulaire violente et rapide, favorable au développement du pathogène nécrotrophe, comme dans le cas de la résistance monogénique vis-à-vis de *Corynespora cassiicola* chez le concombre (Wen et al., 2015). Il n'est cependant pas exclu qu'une telle situation puisse être observée avec nos filtrats sur d'autres familles bi-parentales (si un récepteur spécifique de l'un des effecteurs fongiques sécrété dans les filtrats est présent chez l'un des parents et de manière variable dans les descendance).

4.1.5 Effets principaux et interaction *Hevea* x *Corynespora*

La méthode du test toxinique permet d'estimer les réponses de différents clones à différents traitements toxiques. La réponse d'une combinaison clone x traitement toxinique peut être considérée comme l'effet cumulé de deux effets principaux, la sensibilité du clone et l'agressivité du traitement toxinique, et d'un effet spécifique d'interaction entre ce clone et ce traitement toxinique.

Selon le modèle statistique de régression linéaire, on peut décomposer la réponse en la somme de trois effets indépendants. Cette approche, bien qu'assez robuste, suppose cependant que les conditions du modèle soient remplies, notamment la normalité de la distribution des résidus et l'homoscédasticité (égalité des variances des différentes combinaisons). Ce modèle statistique a été utilisé, notamment pour identifier les écarts

d'interaction significatifs dans chacune des expériences CF (Tab 3-22) et CI (Tab 3-25) et dans le regroupement des deux expériences (Tab 3-27). Ces tableaux font apparaître une prédominance des écarts d'interaction parmi les réponses élevées des combinaisons comportant un clone sensible et/ou un traitement toxinique agressif. Ces écarts d'interaction ne sont donc en réalité pas indépendants des effets principaux. L'examen des distributions des résidus dans les expériences CF (Fig 3.16), CI (Fig 3.18) et dans le regroupement des données des deux expériences (Fig 3.19) a montré des distributions symétriques mais comportant, par comparaison avec une distribution normale, un excès de résidus voisins de 0. Cet excès est dû au fait que les variances des résidus des différentes combinaisons étudiées ne sont pas égales mais croissantes avec le niveau des réponses de ces combinaisons. On constate donc que les hypothèses associées au modèle de régression linéaire ne sont pas entièrement vérifiées. Les résultats obtenus par l'emploi de ce modèle doivent être considérés avec prudence, et plutôt comme des pistes de réflexion que comme des résultats acquis.

Une autre façon de s'intéresser aux interactions entre clones et traitements toxiques consiste à examiner les structures fournies par les classifications hiérarchiques des clones et des traitements toxiques des expériences CF (Fig 3.15) et CI (Fig 3.17), ainsi que les structures fournies par les classifications hiérarchiques des traitements toxiques dans les expériences réalisées sur les populations Pop1 (Fig 3.25) et Pop2 (Fig 3.26).

Concernant l'expérience CF, la principale distinction entre les traitements toxiques porte sur la séparation entre le cluster Tr1 composé de CCP, Tox5 et Tox10 et les deux autres clusters : Tr2 composé de deux filtrats agressifs et Tr3 composé de filtrats peu agressifs à l'exception de CTHA3. La principale distinction entre les clones concerne la séparation entre le cluster CL1 composé des 12 clones les moins sensibles et les deux autres clusters composés de clones sensibles. Les valeurs des réponses indiquent que les clones du cluster CL2 seraient plus sensibles aux traitements du cluster TR1 (de type C/Cas1) qu'à ceux du cluster Tr2 de type A4/Cas0. En revanche, dans le cluster CL3, les clones RRIM901 et FDR4575 apparaissent sensibles aux traitements des deux clusters. Cet examen indique cependant que la matrice des réponses des combinaisons clone x traitement est essentiellement structurée par les effets principaux : sensibilité des clones et agressivité des traitements toxiques. Même si l'on observe une différenciation entre les deux clusters Tr1

et Tr2 qui sont tous deux composés de traitements agressifs, cela ne se traduit pas par des différences importantes de sensibilité des clones aux traitements de ces deux clusters.

Concernant l'expérience CI, la principale distinction entre les traitements toxiques porte sur la séparation entre deux clusters composés de traitements agressifs (Tr1 et Tr2) et un cluster composé de traitements peu agressifs incluant les traitements à blanc (Tr3). On note que les traitements CCP, Tox5 et Tox10 composant le cluster Tr1 sont distingués des autres traitements agressifs composant le cluster Tr2. La principale distinction entre les clones concerne la séparation entre les trois clones très sensibles FDR5788, RRIM926 et FDR4575 composant le cluster CL1 et tous les autres clones composant les clusters CL2 et CL3. Là encore, la matrice des réponses paraît essentiellement structurée par les effets principaux.

Cependant la distinction entre d'une part les traitements CCP, Tox5 et Tox10 et d'autre part d'autres traitements agressifs suggère des réponses différentielles des clones vis-à-vis de ces deux groupes, et donc un effet interactif. Ceci est encore vérifié dans les études des populations Pop1 et Pop2. Concernant Pop1, le Tab 3-31 et la Fig 3.25 confirment cette distinction. Concernant Pop2, le Tab 3-32 et la Fig 3.26 montrent qu'il faut associer à CCP et Tox5 les deux filtrats CCI501 et CNIG404 qui sont tous deux de type C/Cas1.

De l'examen de ces données, on conclut que les écarts d'interaction, positifs ou négatifs, ne sont éventuellement importants que pour certaines combinaisons clone x traitement montrant une réponse élevée du fait des effets principaux. De plus, sur le Tab 3-27 relatif au regroupement des données des deux expériences CF et CI, on note que les écarts d'interaction négatifs, qui modèrent le niveau de réponse lié aux effets principaux, sont observés pour les clones résistants combinés à des traitements agressifs ou pour les clones sensibles combinés à des traitements peu agressifs, tandis que les écarts d'interaction positifs, qui amplifient le niveau de réponse lié aux effets principaux, sont observés pour les clones sensibles combinés à des traitements agressifs. Ceci peut constituer une piste de recherche visant une meilleure compréhension des effets interactifs entre clones et traitements toxiques. Pour l'instant, on retiendra essentiellement l'existence, observée dans plusieurs expériences, d'une réponse différentielle des clones vis-à-vis d'une part de traitements agressifs comme CCP, CCI501 et CNIG404, de type C/Cas1, et d'autre part d'autres traitements agressifs comme CSRI5, CIND3, CCI6, CCI13, CCI434 et CCI403 qui sont de type A4/Cas0 et auxquels il faut ajouter le filtrat de la souche mutée CCP* devenue de type C/Cas0 du fait de la mutation opérée.

4.2 Conclusion

Le champignon ascomycète de type nécrotrophe *Corynespora cassiicola*, responsable de la maladie CLF des feuilles d'hévéa, fait l'objet de recherches constantes depuis la première grande épidémie survenue en 1985 au Sri Lanka. De nombreux résultats concernant la sensibilité des clones d'hévéa ont été présentés, mais ils sont limités par la complexité des observations en milieu naturel, par l'absence de vérification systématique de l'identité génétique des plantes observées, par des connaissances insuffisantes sur l'épidémiologie du champignon et sur les interactions clone x type de souche x environnement, et enfin par l'absence d'une procédure de phénotypage fiable et assez simple à mettre en œuvre pour prédire le risque épidémique des clones, notamment dans le cadre de la sélection précoce. La présente recherche a permis de finaliser la mise au point d'un test toxinique en conditions contrôlées et d'étudier ses propriétés dans le cadre d'une série d'expériences conduites en France et en Côte d'Ivoire.

Le test toxinique est une méthode de phénotypage utile pour l'étude de la réponse de l'hévéa aux exsudats de *Corynespora*, grâce à sa facilité et sa rapidité de mise en œuvre, sa bonne répétabilité, sa capacité à produire une estimation de la sensibilité des clones d'hévéa et de l'agressivité de différents pathotypes de *Corynespora* à partir des mesures des réponses à une large gamme de combinaisons clone x traitement toxinique. Il a ainsi permis d'élargir considérablement le champ d'étude de la relation phénotypique *Hevea x Corynespora* jusqu'ici limité à quelques clones et quelques souches, dont la souche CCP de type C/Cas1, et à l'effecteur Cas1. Il a notamment permis une première estimation de l'agressivité d'une souche CCP mutée sans cassiicoline et de montrer la présence chez cette souche d'autres effecteurs de pathogénicité que Cas1. L'utilisation d'une toxine ou d'un filtrat sans contact direct avec le champignon permet de travailler sur la plupart des sites de plantation sans risquer de disséminer la maladie. Le test toxinique semble prédictif de la sensibilité au champignon lui-même telle qu'elle peut être testée par inoculation contrôlée de spores ; il pourrait donc remplacer avantageusement la technique d'inoculation pour produire au moins une partie de l'information recherchée par inoculation. Cependant, la comparaison entre les deux techniques est pour l'instant limitée à huit clones et deux souches. Lors de l'étude croisée d'une gamme de clones et d'une gamme de traitements toxiques, le test toxinique a permis de mettre en évidence des effets principaux importants (clones et traitements toxiques) ainsi que l'existence d'interactions significatives. L'importance relative de ces interactions devrait

être étudiée de façon plus approfondie. La confirmation du caractère modéré des interactions rendrait plus facilement accessible l'objectif de sélection de clones tolérants à tous les types de souches de *Corynespora*, sur la base d'une confrontation des génotypes d'hévéa limitée à quelques souches de référence, notamment les souches de type C/Cas1 et A4/Cas0. L'application du test toxinique sur la famille bi-parentale PB260 x RRIM600 a permis d'identifier pour la première fois des QTL associés à la sensibilité aux exsudats de *Corynespora*, de constater l'absence de QTL majeur et donc de conclure à l'existence d'un déterminisme polygénique de la tolérance, au moins pour le fond génétique porté par cette famille.

Les résultats obtenus grâce à ce test toxinique ouvrent donc des perspectives intéressantes, à la fois pour la sélection et pour des études plus fondamentales de l'interaction *Hevea x Corynespora*.

4.3 Perspectives

Cette recherche portant sur le test toxinique s'inscrit dans un projet global portant sur le pathosystème *Hevea x Corynespora*. Des recherches sont en cours, visant à purifier d'autres toxines, notamment chez des souches agressives de type A4/Cas0 importantes en Afrique de l'ouest (Jeyakumar, 2015). D'autres travaux visent le développement de méthodes moléculaires de diagnostic de la présence de *Corynespora* sur des hévéas de plantation soumis à des attaques fongiques foliaires. Le séquençage de référence du champignon pour la souche CCP (Lopez et al., 2015), disponible sur le site du DOE-JGI (<http://genome.jgi.doe.gov/Corca1/Corca1.home.html>) a permis de lancer une recherche large sur l'ensemble des effecteurs potentiels de cette souche (Lopez et al., en préparation). Concernant l'inoculation contrôlée de spores, la présente recherche a été réalisée sur feuilles détachées, et une étude récente (Lorient, 2016) a permis de tester une méthode réalisée en phytotron sur plantes entières, avec des résultats montrant une assez bonne relation avec ceux qu'on obtient par inoculation sur feuilles détachées ou par le test toxinique. Il convient de préciser que le financement de ces recherches par l'Institut Français du Caoutchouc vise le développement de méthodes de lutte dans les zones d'opération des sociétés membres, notamment en Afrique de l'ouest où est actuellement développé un projet de sélection précoce de nouveaux clones d'hévéa. A ce titre, l'étude de la diversité des souches en Afrique de l'ouest est poursuivie (Ribeiro et al, en préparation), et un projet de recherche épidémiologique est envisagé.

La suite immédiate de cette recherche sera d'appliquer le test toxinique à l'ensemble des nouveaux clones actuellement en cours de sélection en Afrique de l'ouest. L'objectif sera de produire une première information sur la sensibilité potentielle de ces clones. On ne pourra cependant pas encore utiliser directement cette information pour la sélection précoce car les relations entre les estimations de sensibilité clonale obtenues par ce test et les risques épidémiques des clones dans les plantations restent à préciser. Au stade actuel, il faut en effet éviter de contre-sélectionner des clones performants sur un critère indirect incertain du risque épidémique. En revanche, la mise en relation des informations de ce test avec d'autres informations provenant d'essais en champ peut d'une part permettre d'identifier plus rapidement des clones très sensibles, et d'autre part de contribuer à préciser la relation entre les résultats du test toxinique et les risques épidémiques des clones.

A ce titre, il serait utile de définir un dispositif expérimental en champ dédié spécifiquement à l'évaluation des sensibilités clonales à *Corynespora* en conditions naturelles, conçu pour favoriser le développement de la maladie, et permettant d'étudier un nombre assez important de clones. Ce dispositif constituerait un stade intermédiaire entre d'une part le test toxinique et d'autre part les champs de clones à grande échelle et les parcelles de plantation, où le développement non prévisible d'attaques de la maladie rend aléatoire la possibilité d'observations. Ce dispositif inclurait notamment les clones dont le risque épidémique (important ou faible) est bien connu, permettant ainsi de constituer une gamme d'appréciation de la sensibilité des autres clones. Ce type d'essai pourrait constituer un support utile pour l'étude épidémiologique envisagée du pathosystème *Hevea x Corynespora*.

On pourra réaliser la détection de QTL associés au test toxinique sur la seconde famille cartographiée dans le cadre du projet de sélection précoce et sélectionnée en champ, la famille PB260 x RRIC100, intéressante par la présence du père RRIC100 qui est jugé très résistant en plantation mais assez sensible selon le test. Cette étude permettra de comparer les réponses des deux familles, qui ne diffèrent que par les pères, aux traitements déjà appliqués à la famille PB260 x RRIM600, afin d'identifier d'éventuels QTL communs dus notamment à la mère commune RRIM600. La poursuite de cette approche par détection de QTL permettrait d'acquérir progressivement une information croissante sur les caractéristiques génétiques des clones parentaux utilisés pour la sélection.

La méthodologie du test toxinique peut faire l'objet de recherches complémentaires pour en améliorer la précision. La mesure C1 constituant le véritable critère de réponse des combinaisons clone x traitement toxinique, il serait utile d'identifier un ou des facteurs influençant cette réponse indépendamment des clones et des traitements toxiques appliqués. La mise en covariable de ces facteurs pourrait ainsi permettre de réduire la variabilité non contrôlée entre les répétitions réalisées pour chaque combinaison.

La recherche sur la méthode du test d'inoculation en condition contrôlées, sur feuilles détachées et sur plantes entières devrait être poursuivie. Il convient d'élargir l'étude du test sur feuilles détachées à d'autres clones et d'autres souches pour confirmer la valeur générale de la corrélation observée sur seulement huit clones et deux souches entre le test toxinique et le test d'inoculation. La pratique du test d'inoculation en phytotron sur plantes entières permettrait de préciser la durée des stades foliaires sensibles selon les clones, de tester des cinétiques d'inoculation plus longues que les cinq jours possibles au maximum avec les feuilles détachées, et d'estimer les durées précédant l'abscission des feuilles selon les combinaisons clone x souche. Certains de ces tests pourraient éventuellement être réalisés en plantation dans des conditions proches des conditions naturelles ; ils seraient alors limités aux seules souches isolées localement.

En amont des recherches sur le phénotypage de la réponse des clones d'hévéa à *Corynespora*, les recherches portant sur les effecteurs de différentes souches devraient être poursuivies (reséquençages, identification de gènes, études d'expression génique). Ces recherches, visant une meilleure compréhension de la diversité de la pathogénicité de *Corynespora*, pourraient aussi faciliter l'identification et la purification d'effecteurs importants utilisables pour le phénotypage par test toxinique. Dans une perspective à plus long terme, on envisage l'identification chez l'hévéa des cibles moléculaires des effecteurs de *Corynespora* (gènes de résistance *R* ou autres). Selon certains auteurs, les effecteurs nécrotrophiques sécrétés *in vitro* expliqueraient une part très large de la réponse du germplasma de diverses espèces végétales (Dangl, 2013; Tan et al., 2015; Vleeshouwers and Oliver, 2014). Ces recherches pourraient déboucher sur l'identification de gènes candidats permettant une sélection génique ou assistée par marqueurs.

Références bibliographiques

- Abeysekara, N.S., Friesen, T.L., Keller, B., and Faris, J.D. (2009). Identification and characterization of a novel host–toxin interaction in the wheat–*Stagonospora nodorum* pathosystem. *Theor. Appl. Genet.* 120, 117–126.
- Abraham, P.D., Wycherley, P.R., and Pakianathan, S.W. (1968). Stimulation of latex flow in *Hevea brasiliensis* of 4-amino-3,5,6- trichloropicolinic acid and 2-chloroethane-phosphonic acid. *ResearchGate* 20, 291–305.
- Achour, Z. (2014). Cartographie génétique de la famille F1 PB260 x RRIM600 (*Hevea brasiliensis*) et détection de QTLs associés à la croissance. Master 2. SupAgro Montpellier.
- Archer, B.L., and Audley, B.G. (1987). New aspects of rubber biosynthesis. *Bot. J. Linn. Soc.* 94, 181–196.
- Atan, S., and Hamid, N.H. (2003). Differentiating races of *Corynespora cassiicola* using RAPD and internal transcribed spacer markers. *J. Rubber Res.* 6, 58–64.
- Awoderu, V.A. (1969). A new leaf spot of Para rubber *Hevea brasiliensis* in Nigeria. *Plant Dis. Report.* 406–408.
- Backhaus, R.A. (1985). Rubber Formation in Plants—a Mini-Review. *Isr. J. Bot.* 34, 283–293.
- Barthe, P., Pujade-Renaud, V., Breton, F., Gargani, D., Thai, R., Roumestand, C., and de Lamotte, F. (2007). Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. *J. Mol. Biol.* 367, 89–101.
- Breton, F., Garcia, D., Sanier, C., Eschbach, J.M., and d’Auzac, J. (1997a). L’interaction entre *Corynespora cassiicola* et *Hevea brasiliensis*. *Plant. Rech. Dév.* 4, 322–335.
- Breton, F., Sanier, C., and d’Auzac, J. (1997b). Scopoletin production and degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassiicola*. *J. Plant Physiol.* 151, 595–602.
- Breton, F., Sanier, C., and D’Auzac, J. (2000). Role of cassiicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of Hevea. *J. Rubber Res.* 3, 115–128.
- Chanruang, N. (2000). Status of *Corynespora* leaf fall in Thailand. In IRRDB Workshop on *Corynespora* Leaf Fall of Rubber, 6-14 June, (Kuala Lumpur, Malaysia and Medan, Indonesia).
- Chee, K.H. (1988). Studies on sporulation, pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* on Hevea rubber. *J. Nat. Rubber Res.* 3, 21–29.
- Chee, K.H. (1990). Present status of rubber diseases and their control. *Rev. Plant Pathol.* 69, 423–430.
- Chen, J.-Y., Huang, J.-Q., Li, N.-Y., Ma, X.-F., Wang, J.-L., Liu, C., Liu, Y.-F., Liang, Y., Bao, Y.-M., and Dai, X.-F. (2015). Genome-wide analysis of the gene families of resistance gene analogues in cotton and their response to *Verticillium* wilt. *BMC Plant Biol.* 15, 148.

- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814.
- Clément-Demange, A., Priyadarshan, P.M., Hoa, T.T.T., and Venkatachalam, P. (2007). Hevea rubber breeding and genetics. *Plant Breed. Rev.* 29, 177.
- Collado, J., Platas, G., Gonzalez, I., and Pelaez, F. (1999). Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol.* 144, 525–532.
- Combe, J.-C., and Plessix, C.-J. (1974). Etude du developpement morphologique d'hévéa. *Ann. Sci. forest.*, 31(4), 207–22.
- Compagnon, P. (1986). Le Caoutchouc naturel: biologie, culture, production (G.-P. Maisonneuve et Larose).
- Cornish, K., Siler, D.J., Grosjean, O., and Goodman, N. (1993). Fundamental similarities rubber particle architecture and function in three evolutionarily divergent plant species. *J. Nat. Rubber Res.* 275–285.
- Cubry, P., Pujade-Renaud, V., Garcia, D., Espeout, S., Le Guen, V., Granet, F., and Seguin, M. (2014). Development and characterization of a new set of 164 polymorphic EST-SSR markers for diversity and breeding studies in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). *Plant Breed.* 133, 419–426.
- Dangl, J.L. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment (Science (746)). *Science* 341.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.
- D'Auzac, J. (1965). Etude de quelques réactions métaboliques liées, au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*, à la biogénèse du caoutchouc. Paris
- D'Auzac, J., and Ribailier, D. (1969). L'éthylène nouvel agent stimulant de la production de latex chez l'*Hevea brasiliensis*. *Rev. Générale Caoutch. Plast.* 46, 857–858.
- D'Auzac, J., Chrestin, H., Marin, B., and Lioret, C. (1982). A plant vacuolar system : the lutoïds from *Hevea brasiliensis* latex. *Physiol. Végétale* 20, 311–331.
- D'Auzac, J., Prevot, J.C., and Jacob, C. (1995). What's new about lutoïds ? A vacuolar system model from *Hevea* latex. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 765–777.
- Deighton, F.C. (1936). Preliminary list of fungi and diseases of plants in Sierra Leone. *Bull. Misc. Inf. R. Bot. Gard. Kew* 1936, 397–424.
- Delabarre, M., and Serier, J.-B. (1995). L'hévéa (Paris: Maisonneuve & Larose).
- Déon, M., Scomparin, A., Tixier, A., Mattos, C.R.R., Leroy, T., Seguin, M., Roeckel-Drevet, P., and Pujade-Renaud, V. (2012a). First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. *Fungal Divers.* 54, 87–99.
- Déon, M., Bourré, Y., Gimenez, S., Berger, A., Bieysse, D., de Lamotte, F., Poncet, J., Roussel, V., Bonnot, F., Oliver, G., et al. (2012b). Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Sci.* 185–186, 227–237.

- Déon, M., Fumanal, B., Gimenez, S., Bieysse, D., Oliveira, R.R., Shuib, S.S., Breton, F., Elumalai, S., Vida, J.B., Seguin, M., et al. (2014). Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. *Fungal Biol.* *118*, 32–47.
- Dijkman, M.J. (1951). *Hevea: Thirty years of research in the far east* (The chronica botanica co, Waltham, mass: U.S.A; 348p).
- Dixon, L.J., Schlub, R.L., Pernezny, K., and Datnoff, L.E. (2009). Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* *99*, 1015–1027.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 539–548.
- Dung, P.T., and Hoan, N.T. (2000). Current status of *Corynespora* leaf fall on rubber in Vietnam. In IRRDB Workshop on *Corynespora* Leaf Fall of Rubber, 6-14 June 2000, (Kuala Lumpur, Malaysia and Medan, Indonesia).
- Ehret, M. (1941). Production en Caoutchouc de l'Indochine. Sa production actuelle. Sa production dans le proche avenir. Ses possibilités futures. *Rev. Bot. Appliquée Agric. Colon.* *21*, 396–406.
- Faris, J.D., and Friesen, T.L. (2009). Reevaluation of a tetraploid wheat population indicates that the Tsn1-ToxA interaction is the only factor governing *Stagonospora nodorum* blotch susceptibility. *Phytopathology* *99*, 906–912.
- Faris, J.D., Zhang, Z., Lu, H., Lu, S., Reddy, L., Cloutier, S., Fellers, J.P., Meinhardt, S.W., Rasmussen, J.B., Xu, S.S., et al. (2010). A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 13544–13549.
- Fernando, T., Jayasinghe, C.K., Wijesundera, R.L.C., Silva, W.P.K., and Nishantha, E. (2010). Evaluation of screening methods against *Corynespora* leaf fall disease of rubber (*Hevea brasiliensis*). Beurteilung von Methoden zum Screening der *Corynespora*-Blattfallkrankheit des Gummibaums (*Hevea brasiliensis*). *J. Plant Dis. Prot.* *24*–29.
- Flor, H.H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* *9*, 275–296.
- Frey-Wissling, A. (1932). Studies on the dilution reaction and the movement of the latex of *Hevea brasiliensis* during tapping. *Arch Rubbercult* *16*, 285–327.
- Friesen, T.L., and Faris, J.D. (2012). Characterization of Plant-Fungal Interactions Involving Necrotrophic Effector-Producing Plant Pathogens. *ResearchGate* *835*, 191–207.
- Friesen, T.L., Stukenbrock, E.H., Liu, Z., Meinhardt, S., Ling, H., Faris, J.D., Rasmussen, J.B., Solomon, P.S., McDonald, B.A., and Oliver, R.P. (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat. Genet.* *38*, 953–956.
- Friesen, T.L., Meinhardt, S.W., and Faris, J.D. (2007). The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner: SNB of wheat is induced by multiple toxins. *Plant J.* *51*, 681–692.
- Friesen, T.L., Faris, J.D., Solomon, P.S., and Oliver, R.P. (2008). Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cell. Microbiol.* *10*, 1421–1428.

- Friesen, T.L., Chu, C.-G., Liu, Z.H., Xu, S.S., Halley, S., and Faris, J.D. (2009). Host-selective toxins produced by *Stagonospora nodorum* confer disease susceptibility in adult wheat plants under field conditions. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* 118, 1489–1497.
- Gallais, A. (1997). Combined testcross and S1 selection for the improvement of testcross and inbred performances. *Crop Sci.* 37, 1126–1133.
- Gao, Y., Faris, J.D., Liu, Z., Kim, Y.M., Syme, R.A., Oliver, R.P., Xu, S.S., and Friesen, T.L. (2015). Identification and Characterization of the SnTox6-Snn6 Interaction in the Para*Stagonospora nodorum*–Wheat Pathosystem. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 615–625.
- Garcia, D. (1997). Rapport bibliographique: la biologie, la diversité et les méthodes de lutte contre deux parasites foliaires de l'Hevea: *Corynespora cassiicola* et *Colletotrichum gloesporioides*.
- George, M.K., and Edathil, T.T. (1980). A report on *Corynespora* leaf spot disease on mature rubber. (Kottayam, India).
- Gidrol, X., Chrestin, H., Tan, H.L., and Kush, A. (1994). Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J. Biol. Chem.* 269, 9278–9283.
- Girish, K., Shankara, B., and Raveesha, K.A. (2009). Crude toxin extract from culture filtrate of *Phomopsis azadirachtae* infecting neem and its phytotoxicity. *Int. J. Integr. Biol.* 6, 79–84.
- Gohet, Eric, Jean-Claude Prévôt, Jean-Marie Eschbach, Anne Clément, and Jean-Louis Jacob (1996). Hevea Latex Production, Relationship with Tree Growth, Influence of Clonal Origin and Ethrel Stimulation. Communication sans actes. Symposium on Physiological and Molecular Aspects of the Breeding of Hevea Brasiliensis. <http://agritrop.cirad.fr/464404/>, accessed September 10, 2016.
- Gomez, J.B. (1975). Comparative ultracytology of young and mature latex vessels in *Hevea brasiliensis*. RRIM (ed) International Rubber conference, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Gomez J., and Moir G. (1979). The ultracytology of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. Malays. Rubber Res. Dev. Board *Monogr. no 4*.
- Gond, S.K., Verma, V.C., Kumar, A., Kumar, V., and Kharwar, R.N. (2007). Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos Correae* (Rutaceae) from Varanasi (India). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1371–1375.
- Guyot, J., Omanda, E.N., Ndoutoume, A., Otsaghe, A.-A.M., Enjalric, F., and Assoumou, H.-G.N. (2001). Effect of controlling *Colletotrichum* leaf fall of rubber tree on epidemic development and rubber production. *Crop Prot.* 20, 581–590.
- Hallé, F., and Martin, R. (1968). Étude de la croissance rythmique chez l'Hévéa (*Hevea brasiliensis* Müll-Arg.-Euphorbiacées-Crotonoïdées) | BHL-Europe Portal. *Adansonia* 8, 475–503.
- Heil, M., and Land, W.G. (2014). Danger signals – damaged-self recognition across the tree of life. *Front. Plant Sci.* 5.
- Herbette, S., Menn, A.L., Rousselle, P., Ameglio, T., Faltin, Z., Branlard, G., Eshdat, Y., Julien, J.-L., Drevet, J.R., and Roeckel-Drevet, P. (2005). Modification of

- photosynthetic regulation in tomato overexpressing glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1724, 108–118.
- Hieu, N.D., Nghia, N.A., Chi, V.T.Q., and Dung, P.T. (2014). Genetic diversity and pathogenicity of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber trees and other hosts in Vietnam. *J. Rubber Res.* 17, 187–203.
- Huang, H.-K., Liu, C.-E., Liou, J.-H., Hsiue, H.-C., Hsiao, C.-H., and Hsueh, P.-R. (2009). Subcutaneous infection caused by *Corynespora cassiicola*, a plant pathogen. *J. Infect.* 60, 188–190.
- Idicula, S.P., Jacob, C.K., Manju, M., and Kothandaraman, R. (2000). Current status of *Corynespora* leaf fall disease in India. In IRRD B Workshop on *Corynespora* Leaf Fall/ of Rubber, 6 -14, June 2000, (Malaysia and Medan, Indonesia).
- Ismail H., and Jeyanayagi I. (1999). Occurrence and identification of physiological races of *Corynespora cassiicola* of *Hevea*. In Proceedings of IRRDB Symposium, (Hainan Publishing House), pp. 263–272.
- Jacob, J.L., Prévôt, J.C., Lacote, R., Gohet, E., Clément, A., Gallois, R., Joet, T., Pujade-Renaud, V., and d'Auzac, J. (1997). Les mécanismes biologiques de la production de caoutchouc par *Hevea*. *Plant. Rech. Dév.*
- Jayasinghe, C.K. (2000). *Corynespora* leaf fall of rubber in Sri Lanka: diversity of the pathogen and pathogenesis. In IRRDB Workshop on *Corynespora* Leaf Fall of Rubber, (Kuala Lumpur, Malaysia).
- Jayasinghe, C.K. (2003). *Corynespora* leaf fall and future of the leading rubber clones in the world. *Bull. Rubber Res. Inst. Sri Lanka* 5–11.
- Jayasinghe, C K (1997). Leaf fall disease: a threat to world NR industry. *Rubber Asia* 55–56.
- Jeyakumar, P. (2015). Purification de la toxine Cas0 du champignon *Corynespora cassiicola*. Master 1. Université de Montpellier.
- Mai, Jing, Stephane Herbet, Marc Vandame, et al. (2010). Contrasting Strategies to Cope with Chilling Stress among Clones of a Tropical Tree, *Hevea Brasiliensis*. *Tree Physiology* 30(11): 1391–1402.
- Jinji, P., Xin, Z., Yangxian, Q., Yixian, X., Huiqiang, Z., and He, Z. (2007). First record of *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea* rubber tree in China. *Australas. Plant Dis. Notes* 2, 35.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Kajornchaiakul, P. (1987). *Corynespora* disease of *Hevea* in Thailand. In Proceedings of IRRDB Symposium on Pathology of *Hevea brasiliensis*, (Chiang Mai, Thailand), pp. 1–5.
- Kettles, G.J., and Kanyuka, K. (2016). Dissecting the Molecular Interactions between Wheat and the Fungal Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Front. Plant Sci.* 7.
- Kim, J., Lim, C.J., Lee, B.-W., Choi, J.-P., Oh, S.-K., Ahmad, R., Kwon, S.-Y., Ahn, J., and Hur, C.-G. (2012). A genome-wide comparison of NB-LRR type of resistance gene analogs (RGA) in the plant kingdom. *Mol. Cells* 33, 385–392.
- Koenning, S.R., Creswell, T.C., Dunphy, E.J., Sikora, E.J., and Mueller, J.D. (2006). Increased Occurrence of Target Spot of Soybean Caused by *Corynespora cassiicola* in the Southeastern United States. *Plant Dis.* 90, 974–974.

- Lakshmanan, P., Jeyarajan, R., and Vidhyasekaran, P. (1990). A boll rot of cotton caused by *Corynespora cassiicola* in Tamil Nadu, India. *Phytoparasitica* 18, 171–173.
- de Lamotte, F., Duviau, M.-P., Sanier, C., Thai, R., Poncet, J., Bieysse, D., Breton, F., and Pujade-Renaud, V. (2007). Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. *J. Chromatogr. B* 849, 357–362.
- Lander, E.S., and Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185–199.
- Le Guen, V., Lespinasse, D., Oliver, G., Rodier-Goud, M., Pinard, F., and Seguin, M. (2003). Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. *Theor. Appl. Genet.* 108, 160–167.
- Le Guen, V., Guyot, J., Mattos, C.R.R., Seguin, M., and Garcia, D. (2008). Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. *Crop Prot.* 27, 1498–1503.
- Le Guen, V., Gay, C., Xiong, T.C., Souza, L.M., Rodier-Goud, M., and Seguin, M. (2011). Development and characterization of 296 new polymorphic microsatellite markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*): New microsatellite markers for rubber tree. *Plant Breed.* 130, 294–296.
- Le Guen, V., Garcia, D., Mattos, C., Fouet, O., Doaré, F., Condina, V., and Seguin, M. (2013). A newly identified locus controls complete resistance to *Microcyclus ulei* in the Fx2784 rubber clone. *Tree Genet. Genomes* 9, 805–812.
- Leconte, A. (1984). La reproduction sexuée de l'*Hevea brasiliensis*. *Rev. Générale Caoutch. Plast.* 61, 71–74.
- Lespinasse, D., Grivet, L., Troispoux, V., Rodier-Goud, M., Pinard, F., and Seguin, M. (2000a). Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. *Theor. Appl. Genet.* 100, 975–984.
- Lespinasse, D., Rodier-Goud, M., Grivet, L., Leconte, A., Legnate, H., and Seguin, M. (2000b). A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, 127–138.
- Lewinsohn, T.M. (1991). The geographical distribution of plant latex. *CHEMOECOLOGY* 2, 64–68.
- Li Boxun, Huang Guixiu, Cai Li, Liu Xianbao, Shi Tao, and Cai Jimiao (2015). cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) inoculated with *Corynespora cassiicola* pathogen. In International Rubber Conference, (Vietnam), pp. 157–175.
- Lidah Yehili J, N'Guetta Assanvo S-P, Gnagne M, Blanc G, Rodier-Goud M, Clément-Demange A, Seguin M, Fanjavola M. 2007. Flux de gènes dans un verger à graines d'hévéas sauvages (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). *Cahiers Agriculture* 16(3): 177-184.
- Liu, Z., Friesen, T.L., Ling, H., Meinhardt, S.W., Oliver, R.P., Rasmussen, J.B., and Faris, J.D. (2006). The Tsn1-ToxA interaction in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem parallels that of the wheat-tan spot system. *Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.* 49, 1265–1273.

- Liu, Z., Faris, J.D., Oliver, R.P., Tan, K.-C., Solomon, P.S., McDonald, M.C., McDonald, B.A., Nunez, A., Lu, S., Rasmussen, J.B., et al. (2009). SnTox3 Acts in Effector Triggered Susceptibility to Induce Disease on Wheat Carrying the Snn3 Gene. *PLOS Pathog* 5, e1000581.
- Liu, Z., Zhang, Z., Faris, J.D., Oliver, R.P., Syme, R., McDonald, M.C., McDonald, B.A., Solomon, P.S., Lu, S., Shelver, W.L., et al. (2012). The Cysteine Rich Necrotrophic Effector SnTox1 Produced by *Stagonospora nodorum* Triggers Susceptibility of Wheat Lines Harboring Snn1. *PLOS Pathog* 8, e1002467.
- Liu, Z., Holmes, D.J., Faris, J.D., Chao, S., Brueggeman, R.S., Edwards, M.C., and Friesen, T.L. (2015). Necrotrophic effector-triggered susceptibility (NETS) underlies the barley- *Pyrenophora teres* f. *teres* interaction specific to chromosome 6H: *Pyrenophora teres* effectors induce susceptibility. *Mol. Plant Pathol.* 16, 188–200.
- Liu, Z.H., Faris, J.D., Meinhardt, S.W., Ali, S., Rasmussen, J.B., and Friesen, T.L. (2004a). Genetic and Physical Mapping of a Gene Conditioning Sensitivity in Wheat to a Partially Purified Host-Selective Toxin Produced by *Stagonospora nodorum*. *Phytopathology* 94, 1056–1060.
- Liu, Z.H., Friesen, T.L., Rasmussen, J.B., Ali, S., Meinhardt, S.W., and Faris, J.D. (2004b). Quantitative Trait Loci Analysis and Mapping of Seedling Resistance to *Stagonospora nodorum* Leaf Blotch in Wheat. *Phytopathology* 94, 1061–1067.
- Liyanage, A.D.S., Jayasinghe, C.K., Liyanage, N.I.S., and Jayaratne, A.H.R. (1986). *Corynespora* leaf spot disease of rubber (*Hevea brasiliensis*)-a new record. *J. Rubber Res. Inst. Sri Lanka* 65, 47–50.
- Liyanage, A de S., Jayasinghe, C.K., and Liyanage, N.I.S. (1989). Losses due to *Corynespora* leaf fall disease and its eradication. In *Proceedings of Rubber Research Institute of Malaysia Rubber Growers Conference*, (Malacca, Malaysia), pp. 401–410.
- Lopez, D., Label, P., Ribeiro, S., Morin, E., Kholer, A., Martin, F., and Pujade-Renaud, V. (2015). Sequence-driven in silico discovery of potential effectors involved in *Corynespora cassiicola* pathogenesis. (Clermont-Ferrand: Jobim), p. 87.
- Lorient, T. (2016). Mise au point d'un test d'inoculation contrôlée de *Corynespora cassiicola* sur plante entière d'hévéa. Rapport de Licence 3. Université de Montpellier.
- Lorieux, M. (1994). Aspects statistiques de la cartographie des marqueurs moléculaires. Document de travail de la mission biométrie, N° 1-94, Cirad.
- Lutts, S., Kinet, J.M., and Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot.* 78, 389–398.
- Mai, J., Herbette, S., Vandame, M., Kositsup, B., Kasemsap, P., Cavaloc, E., Julien, J.-L., Améglio, T., and Roeckel-Drevet, P. (2009). Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* Muell. *Arg. Trees* 23, 863–874.
- Manju, M.J., Vinod, K.K., Idicula, S.P., Jacob, C.K., Nazeer, M.A., and Benagi, V.I. (2010). Susceptibility of *Hevea brasiliensis* clones to *Corynespora* leaf fall disease. *J Mycol PI Patho* 40 2 603 609.
- Mattos, C.R.R., Garcia, D., Pinard, F., and Le Guen, V. (2003). Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste da Bahia. *Fitopatol. Bras.* 28, 502–507.

- Monaghan, J., and Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 349–357.
- Morton, N.E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7, 277–318.
- Newsam, A. (1960). Plant pathology division report. Rubber Res. Inst. Malays. 63–70.
- Nghia, N.A., Kadir, J., Sunderasan, E., Puad Abdullah, M., Malik, A., and Napis, S. (2008). Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. *Mycopathologia* 166, 189–201.
- Okhuoya, J.A. (1986). Seasonal and diurnal changes of two leaf pathogens of Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) in the air of Iyanomo, Nigeria. *Acta Mycol.* 22, 65–71.
- Oliveira, R.R., Vida, J.B., Tessmann, D.J., Aguiar, B.M., and Caixeta, M.P. (2006). Reaction of cucumber hybrids in protected cultivation against isolates of *Corynespora cassiicola*. *Fitopatol. Bras.* 31, 509–512.
- Oliveira, R.R., Vida, J.B., Tessmann, D.J., Aguiar, B. de M., Caixeta, M.P., and Barboza, A.L. (2007). Pathogenicity of *Corynespora cassiicola* isolates on different host plants. *Summa Phytopathol.* 33, 297–299.
- Onesiro, P., Mabuni, C.T., Durbin, R.D., Morin, R.B., Rich, D.H., and Arny, D.C. (1975). Toxin production by *Corynespora cassiicola*. *Physiol. Plant Pathol.* 5, 289–295.
- Perazzolli, M., Malacarne, G., Baldo, A., Righetti, L., Bailey, A., Fontana, P., Velasco, R., and Malnoy, M. (2014). Characterization of resistance gene analogues (RGAs) in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and their evolutionary history of the *Rosaceae* family. *PloS One* 9, e83844.
- Plank, J.E.V. der (1968). Disease resistance in plants. Academic Press.
- Prompttha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., and Jeewon, R. (2007). A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microb. Ecol.* 53, 579–590.
- Qi, Y., Xie, Y., Zhang, X., Pu, J., Zhang, H., Huang, S., and Zhang, H. (2009). Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola*. *Mol. Biotechnol.* 41, 145–151.
- Radzia, N., Sulong, S., and Hidir, S. (1996). The epidemiology of *Corynespora* leaf fall disease of rubber in Malaysia - conidia dispersal pattern. In Workshop on *Corynespora* Leaf Fall Disease of Hevea Rubber Organised by the Indonesian Rubber Research Institute, (Medan, Indonésie), pp. 26–27.
- Rajalakshmi, V.K., and Kothandaraman, R. (1996). Current status of *Corynespora* leaf fall in India. The occurrence and management. In Proceedings of Workshop on *Corynespora* Leaf Fall Disease of Hevea Rubber 16-17 December, (Medan, Indonesia), pp. 37–43.
- Ramakrishnan, T.S., and Pillay, P.N.R. (1961). Leaf spot of rubber caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. Rubber Board Bull. 5, 52–53.
- Rattanawong, R. (2012). QTL mapping in *Hevea brasiliensis* for analysing the genetic determinism of growth, latex production, and the macromolecular structure of

natural rubber. Bangkok : Kasetsart University, 220 p. Thesis Ph. D. : Tropical agricultural : Kasetsart University

- Reddy, L., Friesen, T.L., Meinhardt, S.W., Chao, S., and Faris, J.D. (2008). Genomic Analysis of the Snn1 Locus on Wheat Chromosome Arm 1BS and the Identification of Candidate Genes. *Plant Genome* 1, 55–66.
- Risterucci, A.M., Grivet, L., N’Goran, J. a. K., Pieretti, I., Flament, M.H., and Lanaud, C. (2000). A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Genet.* 101, 948–955.
- Ron, M., and Avni, A. (2004). The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. *Plant Cell* 16, 1604–1615.
- RRIV (2010). Recherche sur la sélection de variétés d’hévéa atteignant un rendement de latex de 3-3,5 tonnes/ha/an (Vietnam). <http://www.rviv.org.vn/>
- Schlub, R.L., Smith, L.J., Datnoff, L.E., and Pernezny, K. (2009). An overview of target spot of tomato caused by *Corynespora cassiicola*. *Acta Hort.* 25–28.
- Schoch, C.L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Boehm, E.W.A., Burgess, T.I., de Gruyter, J., de Hoog, G.S., Dixon, L.J., Grube, M., Gueidan, C., et al. (2009). A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Stud. Mycol.* 64, 1–15.
- Schultes, R.E. (1990). A brief taxonomic view of the genus *Hevea*. In MRRDB Monograph N°14, (Kuala Lumpur, Malaysia: Malaysian Rubber Board), p. 60.
- Seibert, R.J. (1947). A Study of *Hevea* (With its Economic Aspects) in the Republic of Peru. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 34, 261–352.
- Shi, G., Friesen, T.L., Saini, J., Xu, S.S., Rasmussen, J.B., and Faris, J.D. (2015). The Wheat Gene Confers Susceptibility on Recognition of the Necrotrophic Effector SnTox7. *Plant Genome* 8.
- Silva, W.P.K., Deverall, B.J., and Lyon, B.R. (1998). Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. *Plant Pathol.* 47, 267–277.
- Silva, W.P.K., Karunanayake, E.H., Wijesundera, R.L.C., and Priyanka, U.M.S. (2003). Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relationship between host origin and virulence. *Mycol. Res.* 107, 567–571.
- Sinulingga, W., and Soepena, FH. (1996). Current status of *Corynespora* leaf fall in Indonesia. In Proceedings of Workshop on *Corynespora* Leaf Fa Li Disease of Hevea Rubber 16-17 December, (Medan, Indonesia), pp. 29–36.
- Soepena, H. (1983). Gugur da un *Corynespora* pada tanaman kaert di Sumatra Utara Kumpulan makalah Kongres. Natl. Perhimpun. Fitopatol. Indones. Ke VII Di.
- Soepena, H. (1986). Perkembangan dan Penanggulangan Penyakit gugur duan *Corynespora*. In Proceedings Konferensi Nasional Karet, pp. 447–355.
- Suryanarayanan, T.S., Murali, T.S., and Venkatesan, G. (2002). Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Can. J. Bot.* 80, 818–826.
- Suryanarayanan, T.S., Murali, T.S., Thirunavukkarasu, N., Rajulu, M.B.G., Venkatesan, G., and Sukumar, R. (2011). Endophytic fungal communities in woody perennials of

- three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodivers. Conserv.* 20, 913–928.
- Tan, K.-C., Oliver, R.P., Solomon, P.S., and Moffat, C.S. (2010). Proteinaceous necrotrophic effectors in fungal virulence. *ResearchGate* 37, 907–912.
- Tan, K.-C., Phan, H.T.T., Rybak, K., John, E., Chooi, Y.H., Solomon, P.S., and Oliver, R.P. (2015). Functional redundancy of necrotrophic effectors – consequences for exploitation for breeding. *Front. Plant Sci.* 6.
- Tang, C., Yang, M., Fang, Y., Luo, Y., Gao, S., Xiao, X., An, Z., Zhou, B., Zhang, B., Tan, X., et al. (2016). The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation. *Nat. Plants* 2, 16073.
- Tran, D.M. (2012). Cartographie génétique de la famille PB260 x RRIC100 (*Hevea brasiliensis*) par marqueurs microsatellites et électrophorèse capillaire. Master 1. Université de Montpellier 2.
- Tran, D.M. (2013). Optimisation de la cartographie génétique de familles F1 d'hévéa (*Hevea brasiliensis*) pour la détection de QTLs et le développement de la sélection assistée par marqueurs. Master 2. Université de Montpellier 2.
- Tsuda, K., and Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 459–465.
- Van Helten, W.M. (1918). Het oculeiren van Hevea. *Arch V Rubbercult* 187–195.
- Van Ooijen, J.W. (2006). JoinMap®4, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. *Plant Res. Int. B V Kyazma B V*.
- Van Ooijen, J.W. (2009). MapQTL®6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. *Plant Res. Int. B V Kyazma B V*.
- de Vienne, D. (1998). Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales (Quae).
- Vleeshouwers, V.G.A.A., and Oliver, R.P. (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 27, 196–206.
- Watson, I.A. (1970). Changes in Virulence and Population Shifts in Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 8, 209–230.
- Webster, C.C., and Baulkwill, W.J. (1989). Rubber (Burnt Mill, Harlow, Essex, England : New York: Wiley-Blackwell).
- Weinstein, B. (1989). Review of Brazil and the Struggle for Rubber: A Study in Environmental History. *Agric. Hist.* 63, 96–98.
- Wen, C., Mao, A., Dong, C., Liu, H., Yu, S., Guo, Y.-D., Weng, Y., and Xu, Y. (2015). Fine genetic mapping of target leaf spot resistance gene cca-3 in cucumber, *Cucumis sativus* L. *Theor. Appl. Genet.* 128, 2495–2506.
- Whitby, S. (1919). Variation in *Hevea brasiliensis*. *Ann. Bot. os-33*, 313–321.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Acad. Press* 315–322.

- Yang, L., Li, D., Li, Y., Gu, X., Huang, S., Garcia-Mas, J., and Weng, Y. (2013). A 1,681-locus consensus genetic map of cultivated cucumber including 67 NB-LRR resistance gene homolog and ten gene loci. *BMC Plant Biol.* 13, 53.
- Yeang, H.-Y. (2007). Synchronous flowering of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) induced by high solar radiation intensity. *New Phytol.* 175, 283–289.
- Zhang, W., Fraiture, M., Kolb, D., Löffelhardt, B., Desaki, Y., Boutrot, F.F.G., Tör, M., Zipfel, C., Gust, A.A., and Brunner, F. (2013). *Arabidopsis* RECEPTOR-LIKE PROTEIN30 and Receptor-Like Kinase SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED Mediate Innate Immunity to Necrotrophic Fungi[W][OPEN]. *Plant Cell* 25, 4227–4241.
- Zhang, Z., Friesen, T.L., Simons, K.J., Xu, S.S., and Faris, J.D. (2009). Development, identification, and validation of markers for marker-assisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes Tsn1 and Snn2 in wheat. *Mol. Breed.* 23, 35–49.
- Zhang, Z., Friesen, T.L., Xu, S.S., Shi, G., Liu, Z., Rasmussen, J.B., and Faris, J.D. (2011). Two putatively homoeologous wheat genes mediate recognition of SnTox3 to confer effector-triggered susceptibility to *Stagonospora nodorum*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 65, 27–38.

Annexe

Annexe 1: Protocole de l'isolement à partir des feuilles

- ✓ Les feuilles fraîches sont collectées et traitées rapidement si possible pour l'isolement sous la hotte.
- ✓ La stérilisation superficielle des tissus foliaires s'effectue par immersion dans de l'éthanol à 70 % (30 sec), et ensuite dans une solution de sodium hypochloride 2 % (2 min), puis dans de l'éthanol 70 % (30 sec). On rince enfin dans de l'eau stérile.
- ✓ Les segments foliaires sont coupés (environ 3 mm²) dans la zone nécrosée (tache noire), déposés sur le milieu de culture MEA (Malt Extract Agar) additionné d'acide lactique à 0.02 %. La croissance est conduite à 25 °C à l'obscurité. Les champignons émergés sont isolés par repiquage sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) additionné d'acide lactique à 0.02 %
- ✓

Isolement monospore

- ✓ L'isolat est cultivé en boîte de Pétri sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) additionné d'acide lactique 0,02%. La croissance mycélienne est effectuée à l'obscurité, à 25 °C, pendant 3-4 jours. Pour induire la sporulation, les boîtes de Pétri sont transférées en lumière continues 24/24 (Tube fluorescent Philips, lumière du jour, énergie lumineuse 3100 lux) à 25 °C pendant trois jours (Chee 1988). Après cette période, les conidies sont prélevées sous la hotte : on rajoute dans les boîtes de 5 mL Tween20 0.02 % stérile, on racle bien à l'aide d'une anse de platine.
- ✓ La concentration en conidies de la suspension ainsi obtenue est estimée à l'aide d'une cellule de Malassez sous microscope x20, ensuite ajusté à 5000 conidies/mL avec la solution Tween20 0.02% stérile.
- ✓ 50 µL de suspension conidienne est pulvérisée sur milieu PDA et mise à l'obscurité pour 24 h. La germination monospore est identifiée par binoculaire et repiqué sur nouveau milieu de culture PDA (une conidie/boîte pétri)

Stokage

- ✓ Le mycélium est cultivé sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) additionné d'acide lactique 0.02 % (pour inhiber le développement des bactéries) à l'obscurité, à 25 °C. Pour la conservation à long terme, des « plugs » mycéliens (blocs de 5 mm de diamètre prélevés à partir d'une culture sur milieu PDA) sont maintenus à -80 °C dans du glycérol à 20 %.

Annexe 2: Purification de la toxine cassiicoline

Du 10 février au 15 mars 2014 : Purification de la toxine cassiicoline

La purification de la toxine cassiicolinea effectué au labo biochimique selon le protocole de Frédéric de Lamotte comporte deux étapes : purification sur source 15RPC et sur superdex
Effecteurs : Minh, Anne Clément-Vidal, Jean François, Frédéric de Lamotte

Première étape : purification de la toxine sur la colonne « source RPC 15 »

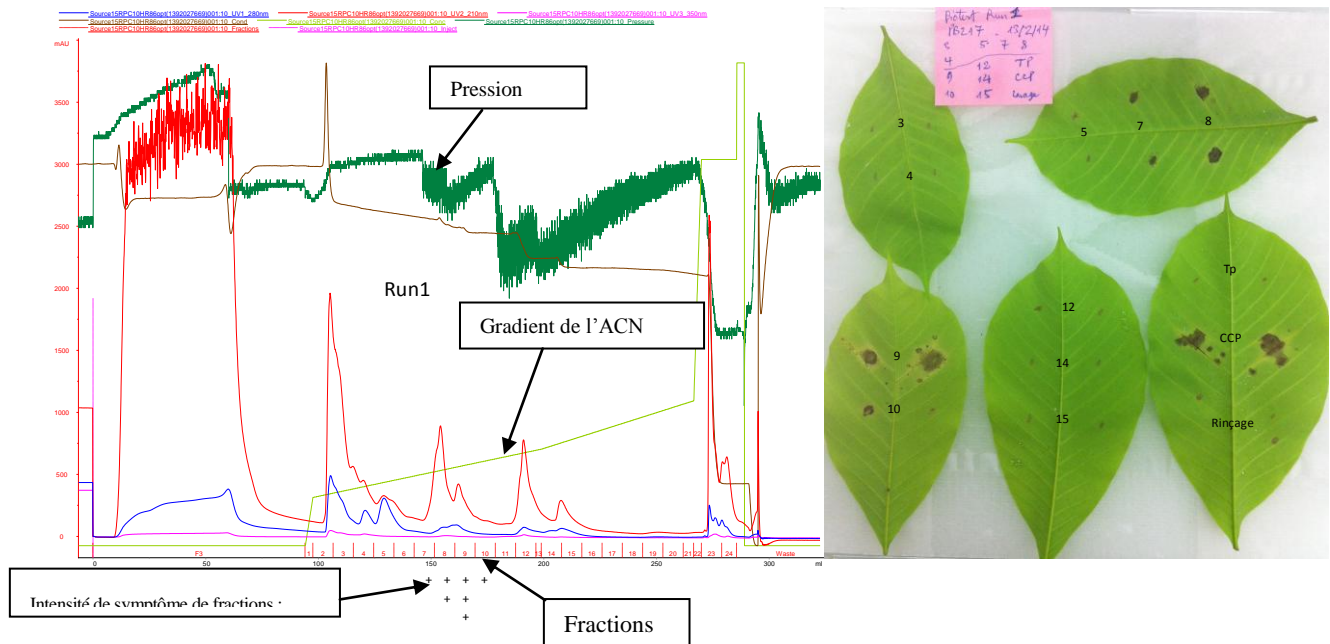
Le principe de cette étape est la séparation des molécules existant dans le filtrat de culture sécrété par souche CCP en fonction de leur hydrophobicité grâce à la colonne RPC15 (ou chromatographie de partage à polarité de phase inversée).

Le test toxique est effectué sur les feuilles détachées de PB217 ou PB260.

Run1 : 50 ml CCP + 1ml ACN + 32,5 µL TFA (à chauffer et à débouler)

Programme:

Column Source 15RPC_HR10/86
Flow_Rate 3.00 {ml/min}
Column_PressureLimit 5.00 {MPa}
Wavelength_1 280 {nm}
Wavelength_2 210 {nm}
Wavelength_3 350 {nm}
Averaging_Time_UV 2.56 {sec}
Pump_A_Inlet A1
Pump_B_Inlet B1
Wash_Inlet_A1_ OFF
Wash_Inlet_A2_ OFF
Wash_Inlet_B1_ OFF
Wash_Inlet_B2_ OFF
Equilibrate_with 5 {CV}
OutletValve_Position F3
Injection_Flow_rate 4.000 {ml/min}
Sample_Volume 60.00 {ml}
Wash_column_with 4.00 {CV}
1_Fraction_Size 9 {ml}
Target_ConcB_1 10.0 {%B}
Length_of_Gradient_1 0.500 {base}
2_Fraction_Size 9 {ml}
Target_ConcB_2 20 {%B}
Length_of_Gradient_2 15.000 {base}
3_Fraction_Size 9 {ml}
Target_ConcB_3 30.00 {%B}
Length_of_Gradient_3 10.000 {base}
4_Fraction_Size 9 {ml}
Target_ConcB_4 80 {%B}
Length_of_Gradient_4 0.500 {base}
5_Fraction_Size 9 {ml}
Target_ConcB_5 80 {%B}
Length_of_Gradient_5 2.00 {base}
Gradient_Delay 2.00 {ml}
Clean_with 0.50 {CV}
Reequilibrate_with 5.00 {CV}



Run 7 : 100 ml CCP + 2 ml ACN + 65 µL TFA

Run 8 : 100 ml CCP + 2 ml ACN + 65 µL TFA

La colonne est sale -> changer des molécules silic -> colonne neuve

Run 9 : 100 ml CCP + 2 ml ACN + 65 µL TFA

Run 10 : 100 ml CCP + 2 ml ACN + 65 µL TFA

Run 11: 100 ml CCP + 2 ml ACN + 65 µL TFA

Laver la colonne : Retourner la colonne -> l'eau -> HCl 1M -> l'eau -> NaOH 1M -> l'eau -> l'isopropanol

Run 12 : Reprise les fractions 1 à 13 de **Run 11** -> 166 ml -> dilution ½ eau -> 332 ml refait l'injection

Run 13 : Reprise 325 ml de toutes les fractions de **Run 7 + Run 8** -> dilution ½ eau -> 650 ml

Résumer la première étape de purification sur RPC : 1100 ml CCP

Run	Volume (mL)	Remarque
Run1	50	
Run2	150	pb de pression
Run3	200	
Run4	50	refait Run2
Run5	100	
Run6	100	
Run7	100	
Run8	100	
Run9	100	
Run10	100	
Run11	100	
Run12	166	refait Run11
Run13	325	refait Run7+Run8

2^{ème} étape : fait de la concentration sur la colonne RPC 15

Regrouper des fractions induisant des symptômes (+++) :

Run	Run1	Run3	Run4	Run5	Run6	Run9	Run10	Run12	Run13
Fraction	9	8, 9, 10	9	8, 9	9, 10	7, 8, 9	8, 9, 10	9	9

- ✓ 17 fractions -> 123 ml
- ✓ On rajoute 1/3 volume eau = 40 ml
- ✓ On rajoute TFA 0.065 % pour 40 ml eau -> 26 µL TFA
=> Volume final à concentrer : 163 ml

Chargement (programme : loadRPCS) : 50 ml/run (chargé dans un superloop) -> 3 runs chargent 50 ml et 1 run charge 12 ml

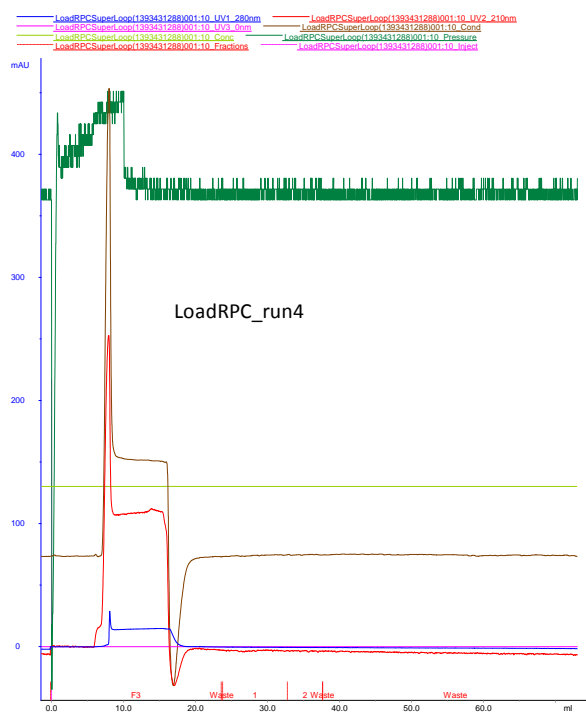
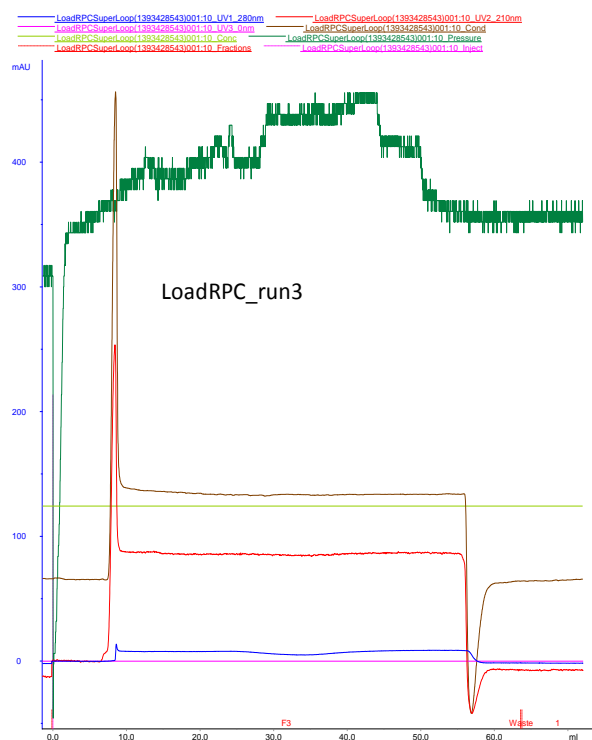
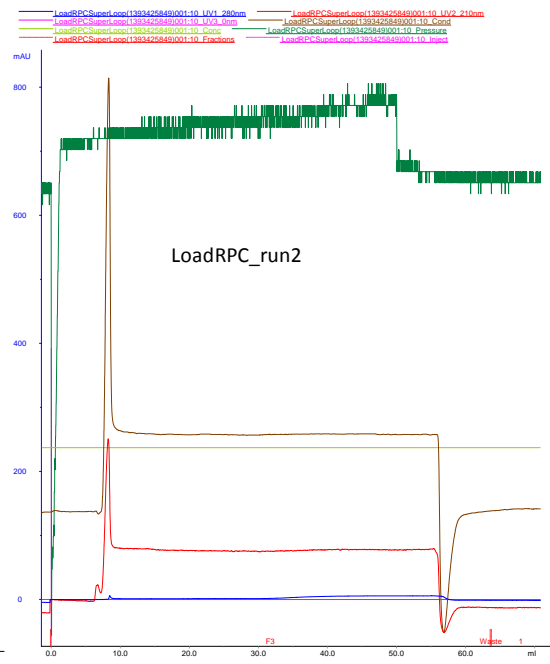
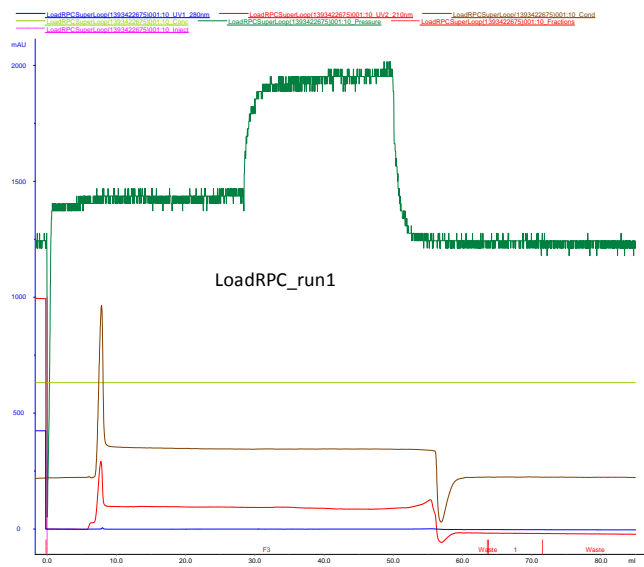
Lavage : après 4 runs de chargement (programme : flushRPC)

Test toxinique sur les feuilles détachées

1^{er} sous-étape : chargement de l'échantillon

Programme:

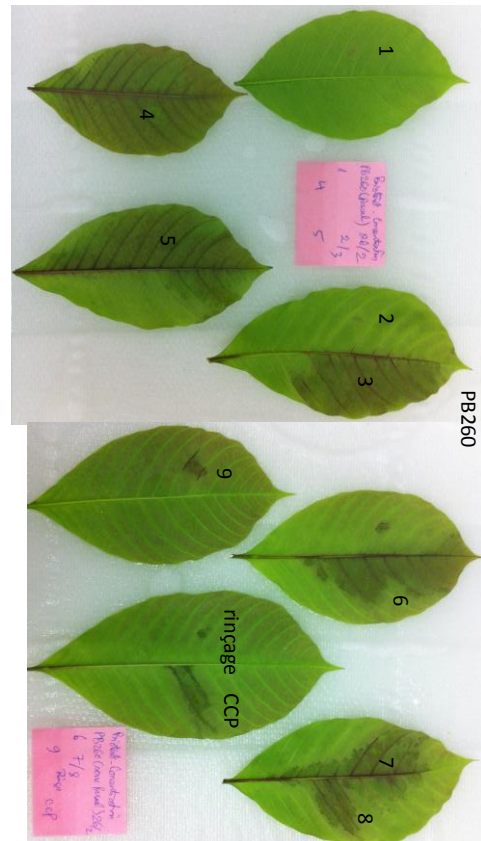
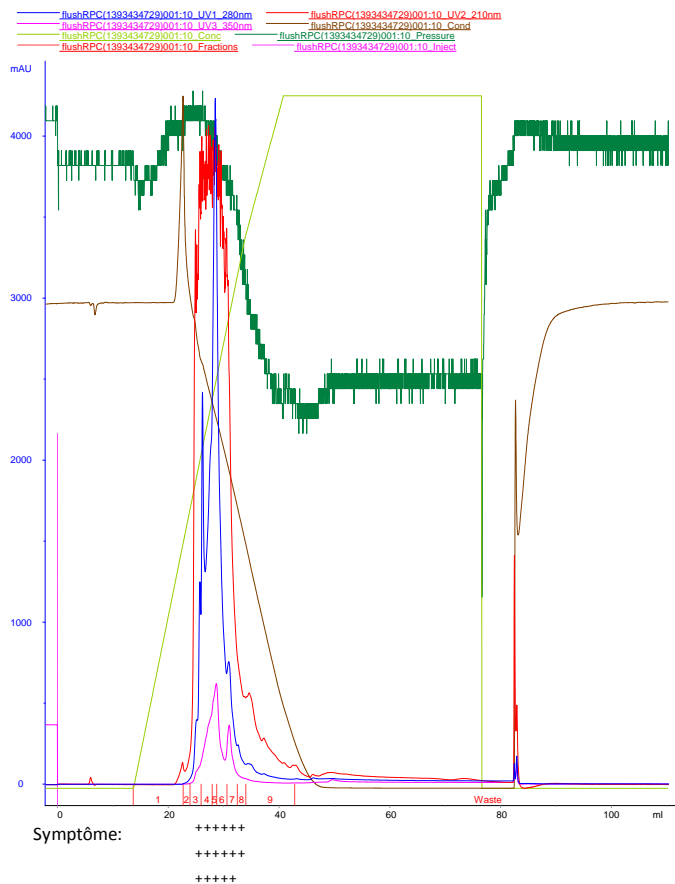
Column Source15RPC_HR10/86
Wash_Inlet_A1_ OFF
Wash_Inlet_A2_ OFF
Wash_Inlet_B1_ OFF
Wash_Inlet_B2_ OFF
Flow_Rate 2.000 {ml/min}
Column_PressureLimit 5.00 {MPa}
Wavelength_1 280 {nm}
Wavelength_2 210 {nm}
Wavelength_3 OFF {nm}
Averaging_Time_UV 2.56 {sec}
Pump_A_Inlet A1
Pump_B_Inlet B1
Start_ConcB 0 {%B}
Equilibrate_with 2 {CV}
System_Pump PressFlowControl
System_PressLevel 4 {MPa}
System_MinFlow 0.1 {ml/min}
OutletValve_Position F3
Empty_loop_with 50 {ml}
Wash_column_with 2 {CV}
Eluate_Frac_Size 9 {ml}
Peak_Frac_Size 0 {ml}
Target_ConcB 0 {%B}
Length_of_Gradient 1.000 {base}
Gradient_Delay 1.00 {ml}
Reequilibrate_with 2.00 {CV}



2^{ème} sous étape : lavage de la colonne PRC (flush RPC):

Programme :

```
Column Source15RPC_HR10/86
Wash_Inlet_A1_ OFF
Wash_Inlet_A2_ OFF
Wash_Inlet_B1_ OFF
Wash_Inlet_B2_ OFF
Flow_Rate 2.000 {ml/min}
Column_PressureLimit 5.00 {MPa}
Wavelength_1 280 {nm}
Wavelength_2 210 {nm}
Wavelength_3 350 {nm}
Averaging_Time_UV 0.01 {sec}
Pump_A_Inlet A1
Pump_B_Inlet B1
Start_ConcB 0 {%B}
Equilibrate_with 2 {CV}
System_Pump PressFlowControl
System_PressLevel 5 {MPa}
System_MinFlow 0.1 {ml/min}
Empty_loop_with 0.1 {ml}
Wash_column_with 2 {CV}
UV_Mode Slope
MinPeakWidth 0.15 {min}
Level 0 {mAU}
Peak_Start_Slope 100 {mAU/min}
Peak_End_Slope 75 {mAU/min}
1_Fraction_Size 9 {ml}
1_PeakFraction_Size 2 {ml}
Target_ConcB_1 80 {%B}
Length_of_Gradient_1 3.00 {base}
2_Fraction_Size 9 {ml}
2_PeakFraction_Size 2 {ml}
Target_ConcB_2 100 {%B}
Length_of_Gradient_2 1.00 {base}
Gradient_Delay 2.00 {ml}
Clean_with 5 {CV}
Reequilibrate_with 5.00 {CV}
```



Fractions testées toxiques : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 + 2 témoins (rinçage et CCP) sur PB260
 Résultats : fractions induisent des symptômes importants : 3, 4, 5, 6, 7, 8

Troisième étape : purification de la toxine cassiicoline sur « Superdex »

Rassembler les fractions 3, 4, 5, 6, 7, 8 de l'étape concentration -> 9ml -> mélanger bien

Calculer le volume mort : dextrane, molécule avec sa taille importante -> marche le plus vite sur la colonne superdex -> calculer le volume mort =

Tampon A : NaPO_4 40mM pH7 ACN 10 %

Laver la boucle avec tampon NaPO_4

Injection 2 ml de l'échantillon au boucle : système control 1 -> Manuel -> Flowpath -> Inject

-> tirer le serygue -> charger 2 ml echantillons -> remettre à load avant d'injection 2 ml échantillons (attention de bulle d'air) -> Run

Lancer le programme :

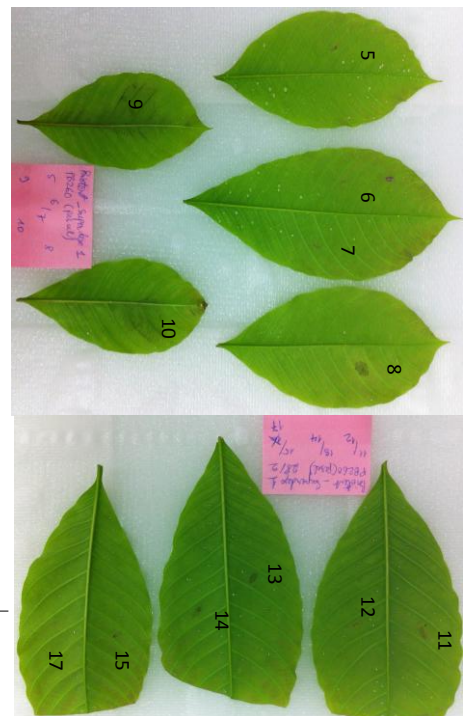
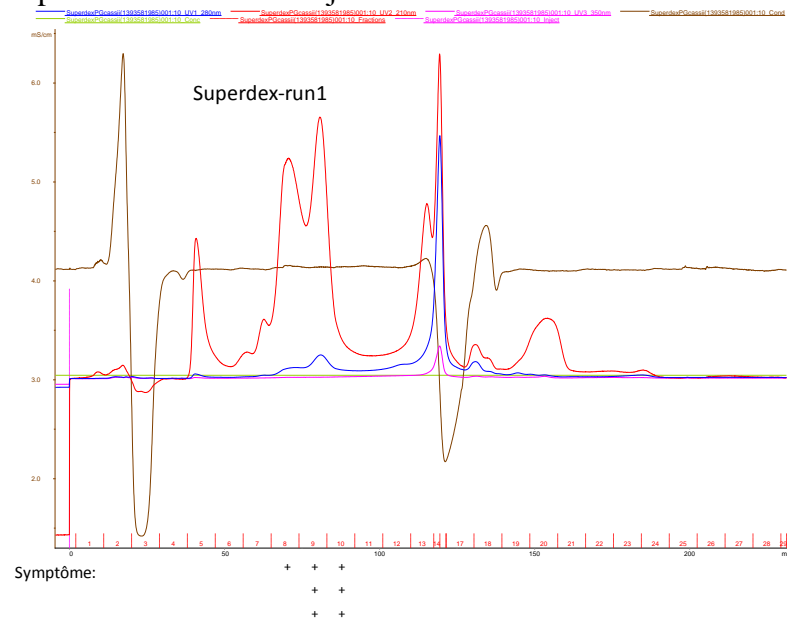
Column Superdex30PG_XK

Wash_Inlet_A1_ OFF

Wash_Inlet_A2_ OFF

Wash_Inlet_B1_ OFF
 Wash_Inlet_B2_ OFF
 FlowRate_Equil 1.300 {ml/min}
 Column_PressureLimit 0.50 {MPa}
 Wavelength_1 280 {nm}
 Wavelength_2 210 {nm}
 Wavelength_3 350 {nm}
 Averaging_Time_UV 1.28 {sec}
 Pump_A_Inlet A1
 Pump_B_Inlet B1
 Start_ConcB 0 {%B}
 Equilibrate_with 0.50 {CV}
 System_Pump PressFlowControl
 System_PressLevel 0.5 {MPa}
 System_MinFlow 0.1 {ml/min}
 FlowRate_WashOut 1.300 {ml/min}
 Empty_loop_with 2 {ml}
 UV_Mode Slope
 MinPeakWidth 0.900 {min}
 Level 0 {mAU}
 Peak_Start_Slope 100 {mAU/min}
 Peak_End_Slope 75 {mAU/min}
 Eluate_Frac_Size 9 {ml}
 Peak_Frac_Size 2 {ml}
 FlowRate_Elution 1.000 {ml/min}
 Length_of_Elution 2 {CV}

Superdex-run1: 2 ml d'injection



Après la purification, on passe l'étape de lyophilisation
Lyophilisation : liquide -> glace -> gaz -> poudre

Ressembler des fractions induisant des symptômes: 8, 9, 10 (superdex-run1); 10, 11, 12 (superdex-run2) ; 9, 10 (superdex-run3) ; 8, 9, 10 (superdex-run4) ; 8, 9 (superdex-run5)
=> Volume final : **77,5 ml** ->homogénéiser (bien mélangé) -> passer l'étape de lyophilisation

Distribuer 18ml aux 4 tubes de 50 ml + 5,5 ml dans un tube de 25 ml servant à l'aliquote (18 x 4 + 5,5 = 77,5 ml)
Glacer ces tubes dans l'azote liquide en tournant des tubes pour augmenter la surface d'échantillon glacé dans ces tubes.
Mettre sur la machine de lyophilisation 48h

Après 48h, on obtient la poudre, mais peut être il existe encore de sel ou ACN -> on rajoute l'eau ultra pure avec le même volume initial (18 ml/tube et 5,5 ml de l'aliquote)
-> refaire la lyophilisation

Doser la concentration : pour la poudre de l'aliquote, on rajoute 1ml eau ultra pure, on fait le DO d'1 ml H₂O et d'1 ml aliquote cassiicoline:

$$A = \log(I/I_0) ;$$

I : rayon initial

I₀ : rayon sort

A : Absorbance

On obtient A = 0.133

Pour estimer la concentration d'1 ml de l'aliquote, on suit la loi Beer-Lambert :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

A : Absorbance

ϵ : co-efficient d'extinction moléculaire

l : longueur de trajet de tube

C : concentration

$$\text{Donc, } C = A/\epsilon \cdot l$$

Consulter ϵ sur le web expasy.org :

Charger l'information de cassiicoline cas1, masse = 2800 Da -- > $\epsilon = 5875 \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$

Ou $\epsilon = 5875/2800 = 2,1 \text{ (g/cm)} -- > 1 \text{ g/l}$

Donc, A = 0.133 → X = 0.06045 µg/l ou bien 60.45 µg/ml ou bien 60.45 ng/µL

Donc, 1ml aliquote contient 60,45 µg

Pour calculer la concentration de cas1 au début de 5,5 ml d'aliquote, elle contient 60.45 µg/ 5.5 ml = 11 µg/ml

Au total, cassiicoline cas1 = 11 x 77.5 = 852 µg

Test toxinique d'aliquote à 5 ng/µL ; à 10 ng/µL ; à 20 ng/µL et 30 ng/µL, sur PB217 et PB260

Diluer 60 ng/µL : 1> à 30 ng/µL = 50 µL + 50 µL H₂O

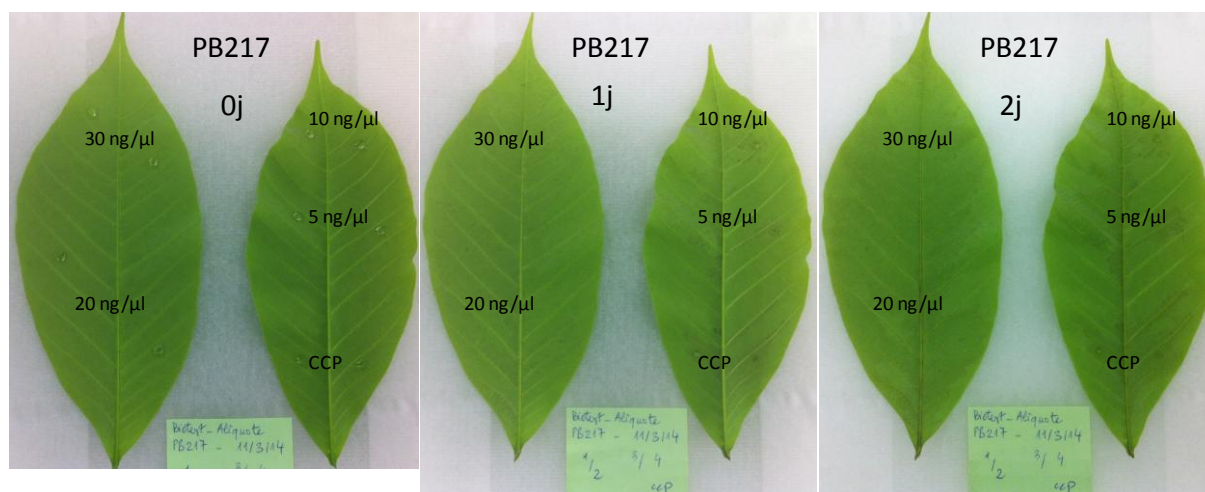
2> à 20 ng/µL = 30 µL + 60 µL H₂O

3> à 10 ng/µL = 10 µL + 50 µL H₂O

4> à 5 ng/μL = 10 μL + 110 μL H₂O

Test toxinique :

Date	Clone	Observation	Rép	30 ng/μL	20 ng/μL	10 ng/μL	5 ng/μL	CCP
12-mars	PB217	1j	R1	+++	+++	+++	++	+++
			R2	+++	+++	+++	++	+++
12-mars	PB260	1j	R1	++	++	++	+	++



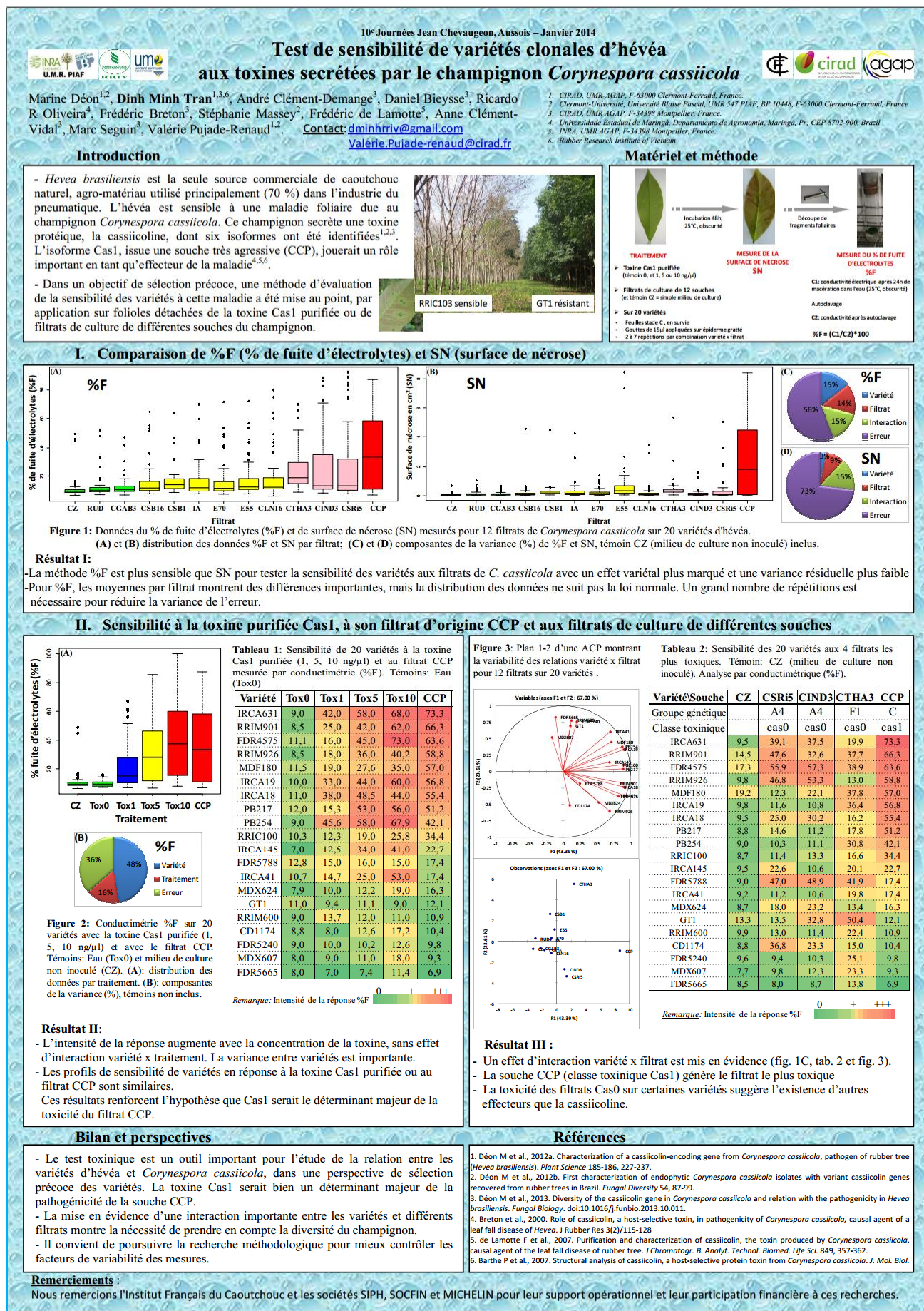
Toute concentration de Cas1 induit des symptômes sur PB260 et PB217. L'intensité de symptôme est corrélée avec la concentration de Cas1. On pourra utiliser ces résultats pour diluer les poudres de Cas1, mais il faut comparer deux lots de Cas1 (Cas1 de Saby et Cas1 de Minh) avant de démarrer le test toxinique pour reproduire le tableau de sensibilité des 20 clones testés à la toxine Cas1 (Saby) en serre

Pour le test toxinique en Côte d'Ivoire, on a besoin au moins de :

$$Y = (20 \text{ clones} + 200 \text{ descendants}) \times 3 \text{ rép} \times 2 \text{ gouttes} \times 15 \text{ μL/goutte} \times 5 \text{ ng/μL} = 99\,000 \text{ (ng)}$$

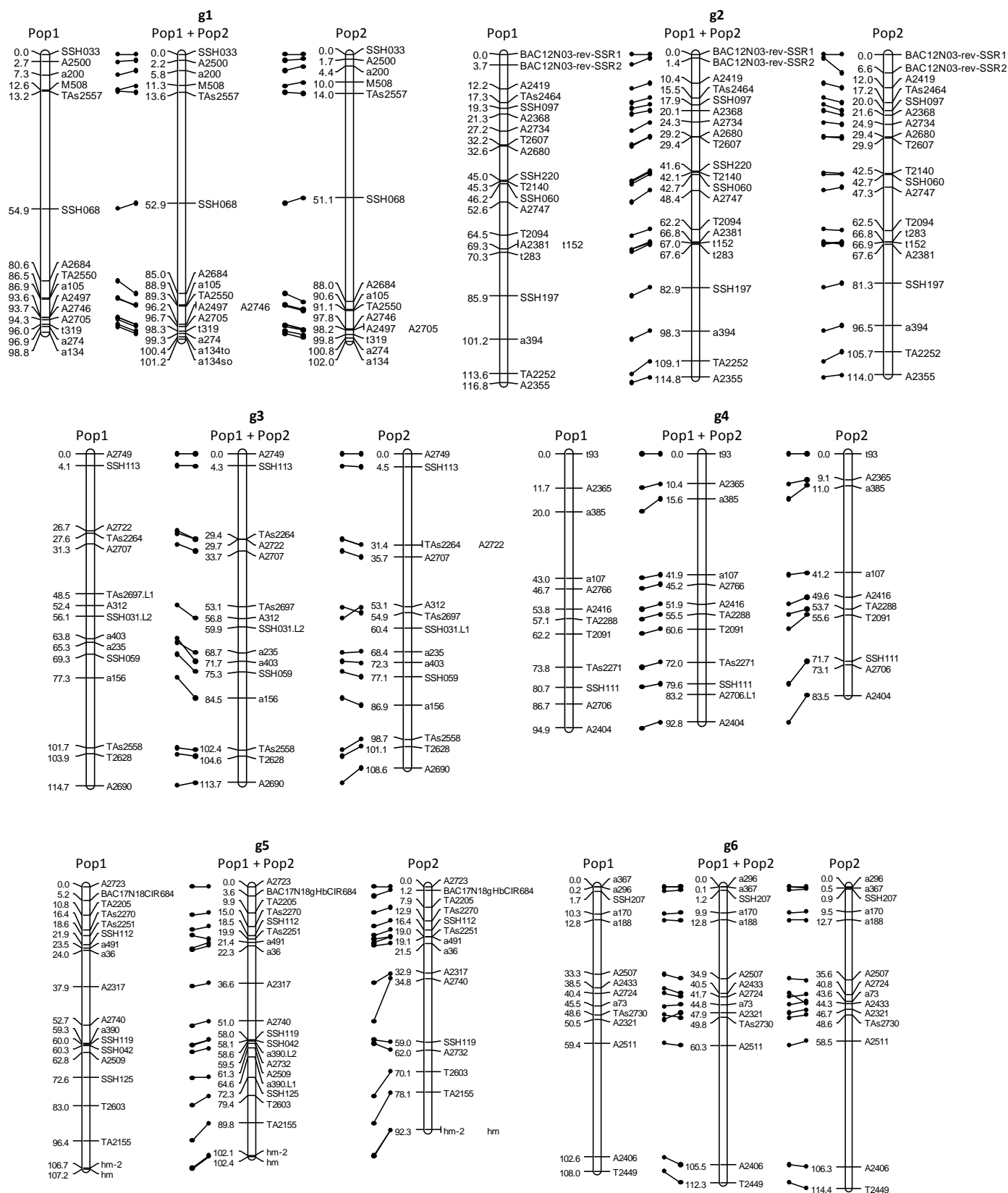
Conclusion : 1.100 ml CCP → 852 μg cas1, c'est suffisant pour 5673 tests toxiniques à 5ng/μL avec 2 gouttes/ test

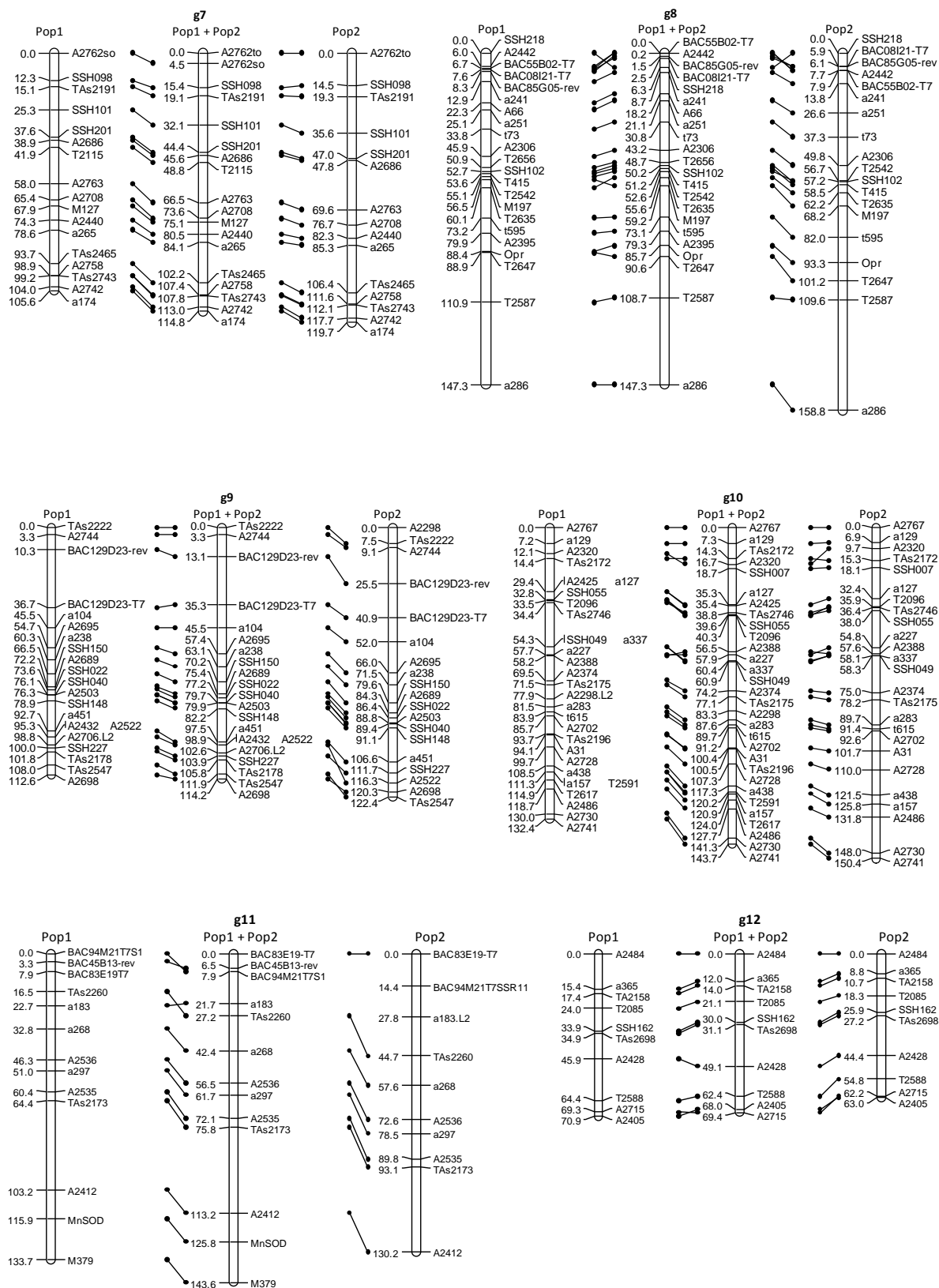
Annexe 3: Poster

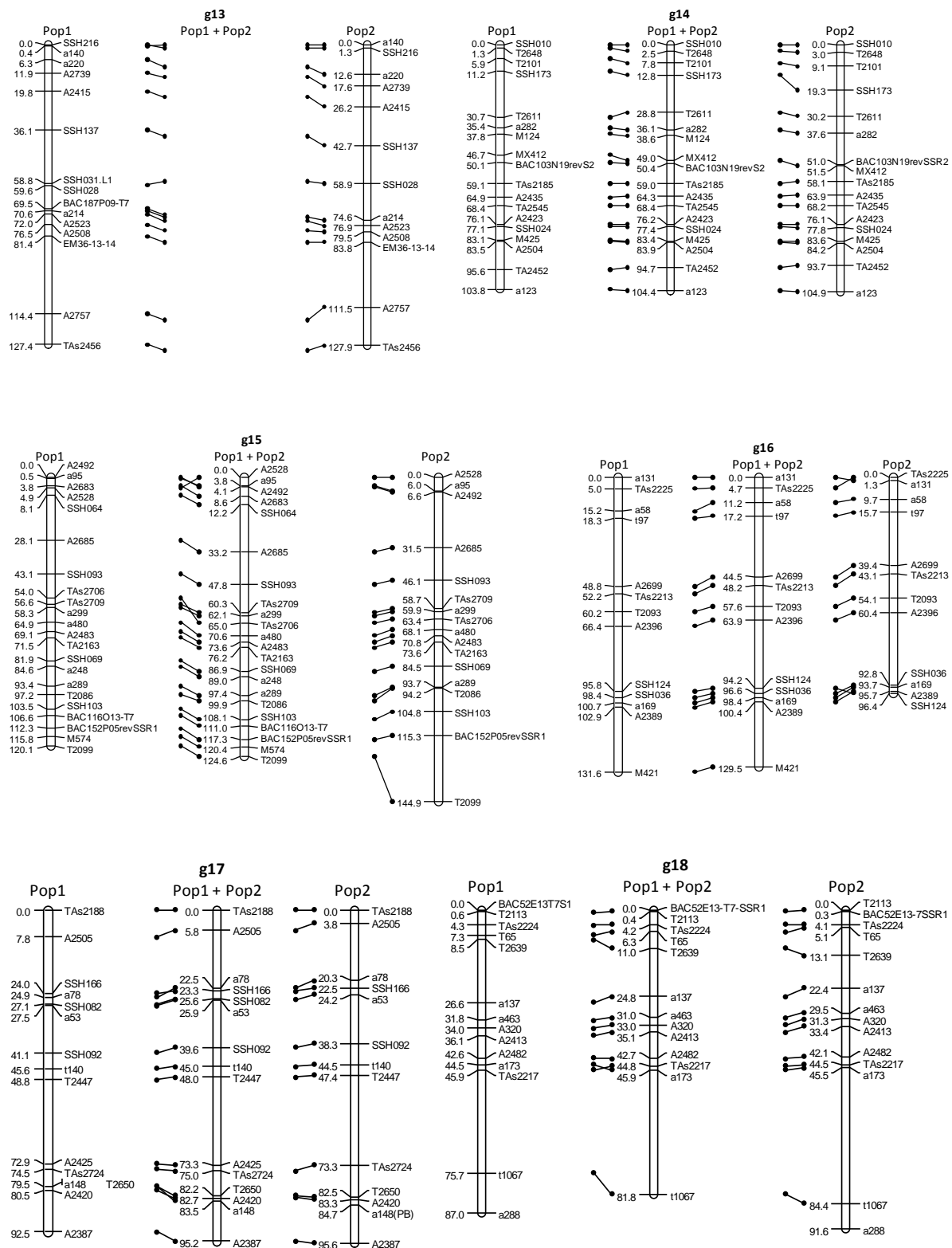


Annexe 4: Alignement des marqueurs des groupes de liaison entre les trois cartes génétiques

Les 392 marqueurs SSRs ont été génotypés sur 191 génotypes du site 1 (SOGB) et 152 génotypes du site 2 (Toupah) de la même famille PB260 x RRM600. Trois cartes génétiques ont été établies par le logiciel JoinMap (version 4.1) pour chaque site et pour deux sites combinés.







Genetic determinism of sensitivity to *Corynespora cassiicola* exudates in rubber tree (*Hevea brasiliensis*)

Tran Dinh Minh^{1,2}, Clément-Demange André², Déon Marine³, Garcia Dominique², Le Guen Vincent², Clément-Vidal Anne², Soumahoro Mouman⁴, Masson Aurélien⁵, Label Philippe^{7,3}, Le Mau Tuy¹, Pujade-Renaud Valérie^{6*}

- ¹. Rubber Research Institute of Vietnam, Ho Chi Minh City, Vietnam
- ². CIRAD, UMR-AGAP, F-34398 Montpellier, France.
- ³. Clermont-Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France.
- ⁴. Société Africaine de Plantations d'Hévéas, Côte d'Ivoire
- ⁵. Société des Caoutchoucs de *Grand-Béréby*, Côte d'Ivoire
- ⁶. CIRAD, UMR-AGAP, F-63000 Clermont-Ferrand, France
- ⁷. INRA, UMR 547 PIAF, Clermont-Ferrand, France

* Corresponding author

E-mail: valerie.pujade-renaud@cirad.fr

Abstract

An indirect phenotyping method was developed in order to estimate the susceptibility of rubber tree clonal varieties to *Corynespora* Leaf Fall (CLF) disease caused by the ascomycete *Corynespora cassiicola*. This method consists in quantifying the impact of fungal exudates on detached leaves by measuring the induced electrolyte leakage (EL%). The tested exudates were either crude culture filtrates from diverse *C. cassiicola* isolates or the purified cassiicolin (Cas1), a small secreted effector protein produced by the aggressive isolate CCP. The test was found to be quantitative, with the EL% response proportional to toxin concentration. For eight clones tested with two aggressive isolates, the EL% response to the filtrates positively correlated to the response induced by conidial inoculation. The toxicity test applied to 18 clones using 13 toxic treatments evidenced an important variability among clones and treatments, with a significant additional clone x treatment interaction effect. A genetic linkage map was built using 306 microsatellite markers, from the F1 population of the PB260 x RRIM600 family. Phenotyping of the population for sensitivity to the purified Cas1 effector and to culture filtrates from seven *C. cassiicola* isolates revealed a polygenic determinism, with six QTL detected on five chromosomes and percentages of explained phenotypic variance varying from 11 to 17 %. Two common QTL were identified for the CCP filtrate and the purified cassiicolin, suggesting that Cas1 may be the main effector of CCP filtrate toxicity. The CCP filtrate clearly contrasted with all other filtrates. The toxicity test based on Electrolyte Leakage Measurement offers the opportunity to assess the sensitivity of rubber genotypes to *C. cassiicola* exudates or purified effectors for genetic investigations and early selection, without risk of spreading the fungus in plantations. However, the power of this test for predicting field susceptibility of rubber clones to CLF will have to be further investigated.

Keywords: *Corynespora cassiicola*, *Hevea brasiliensis*, QTL, CLF, Effector, Cassiicolin, Culture filtrate, Electrolyte Leakage Measurement, Genetic mapping, SSR.

Introduction

The rubber tree (*Hevea brasiliensis*, $2n = 36$) is the only crop developed for the production of natural rubber. With a total of twelve million tons on about 12 million hectares in 2013 (<http://faostat3.fao.org/>), natural rubber production is mostly concentrated in Asia (92 %), followed by West Africa (5 %). Latex is collected regularly by incision of the trunk bark, on trees older than 5-6 years and during 20-30 years. *Hevea* spp. are monoecious and allogamous. *H. brasiliensis* selected elite genotypes are vegetatively propagated by grafting onto seedling rootstocks. Early selection methods are required to assess the main performances of rubber clones prior to long-lasting agronomical studies of the most promising candidates. Rubber tree is affected by several important cryptogamic diseases. In Latin America, from which *Hevea* originated, rubber cropping is severely hampered by the South American Leaf Blight, caused by *Microcyclus ulei*, alias *Pseudocercospora ulei* [1]. However, this disease remains so far confined to that continent. In Asia and Africa, one of the most important diseases is Corynespora Leaf Fall (CLF), caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & M. T. Curtis), C. T. Wei. This ascomycete fungus was first isolated from rubber tree in Sierra Leone [2], then in India [3] and Malaysia [4]. It was really considered dangerous after the epidemic outbreak in Sri Lanka in 1985 [5]. CLF disease is characterized by the development of necrotic lesions on the leaves with frequent blackening of the veins giving a typical “fish-bone” or “railway track” appearance. Both immature and mature leaves are affected, leading to massive defoliation and consequently growth delay and yield losses. Chemical control is technically feasible in nursery, but not sustainable in plantation and harmful to the workers and the environment. Early detection and exclusion of highly susceptible clones is essential to avoid inoculum proliferation and epidemic outbreaks.

Studies in controlled conditions have highlighted the role of a small secreted phytotoxic protein involved in *C. cassiicola* pathogenicity in rubber tree [6-8]. This toxin, named cassiicolin, was purified from a highly aggressive pathogenic isolate, CCP, collected from rubber plantations in the Philippines. It is a glycosylated cysteine-rich small secreted protein (CR-SSP) of 27 amino acids. Rubber clones were tested for their sensitivity to the purified Cas1 using a leaf wilting assay in comparison with conidial inoculation of CCP [6]. The profiles obtained in both cases were in good agreement, suggesting that cassiicolin plays an important role in the virulence of the fungus.

The cassiicolin-encoding gene was found to be transiently expressed in the early phase of infection, just before the occurrence of the first symptoms [9]. Six cassiicolin isoforms (Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5 and Cas6) were identified by PCR-detection on a collection of *C. cassiicola* strains from various host plants and geographical origins [10]. In rare cases, two *Cas* genes (encoding Cas2 and Cas6 isoforms respectively) were detected in the same isolate. However, 53 % of the tested isolates had no detectable *Cas* gene, although some of them were virulent in rubber tree, suggesting that effectors other than cassiicolin may be involved in their virulence. The isolates were classified into six toxin classes based on their *Cas* gene profile: Cas0 (no detectable *Cas* gene), Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5 and Cas2+6.

Several diversity studies have delineated genetic races within the *C. cassiicola* species. However, the concordance of these genetic races with geographical origins or biological traits such as pathogenicity, virulence and host-specificity remains unclear [10-18]. The large genetic diversity of *C. cassiicola* is not structured by strict host-specificities but rather host-specialization, with isolates often able to infect a restricted range of plants rather than a single host [15,17]. We have performed a phylogenetic analysis on 129 *C. cassiicola* isolates, including 71 isolates from rubber tree, from Asian, African and South American countries [10]. Our study revealed at least eight major phylogenetic clades, in rather good coherence with the toxin classes assigned based on the detection and polymorphism of the *Cas* genes. Indeed, all isolates of the same cassiicolin toxin class were grouped within a single genetic clade; the Cas0 isolates were scattered in most genetic groups.

The genetic determinism of rubber tree tolerance/susceptibility to *C. cassiicola* was so far unknown. Previous studies involving QTL approaches had analyzed the genetic determinism of rubber tree tolerance to the South American Leaf Blight (SALB) [19-23] and were later extended to other traits such as growth speed and latex production (unpublished results). Concerning the *H. brasiliensis* x *C. cassiicola* interaction, studies were so far limited by the lack of an effective procedure for phenotyping the susceptibility of rubber clones that would take into account the diversity of the pathogen. Recognition and scoring of the disease in natural conditions is difficult considering the diversity of symptoms attributed to *C. cassiicola* and the possible confusion with other leaf diseases. The sporadic (epidemic) occurrence of the disease is another difficulty for field observation. Several studies have assessed rubber clones resistance/susceptibility in fields and nurseries [5,24,25], but they were of course limited to the local inoculum, thus making extrapolation unreliable.

Inoculation experiments in controlled conditions are largely limited by the difficulty to combine a large panel of rubber tree clones with a large panel of isolates representative of *C. cassiicola* diversity, without taking any risk of contamination; indeed, introducing new virulent isolates for experimentation in rubber-tree growing countries is of course strictly prohibited. An indirect procedure was thus proposed, consisting in testing the sensitivity of rubber clones to fungal exudates rather than susceptibility to the fungus itself [6]. In the initial procedure, the toxicity was either assessed visually (estimation of the leaf necrosis area) or by the leaf wilting assay (measuring water losses). However, the sensitivity of this test for a large range of isolates and clones, and its capacity to predict the sensitivity in field conditions, was questioned [26].

In this article, we present (i) the set-up and validation of an improved phenotyping method based on the response of rubber clones to *C. cassiicola* exudates (culture filtrate or purified toxin), by conductivity measurement of the induced electrolyte leakage, and (ii) the genetic mapping and phenotyping of a biparental rubber tree family for the detection of QTL involved in the sensitivity/tolerance to *C. cassiicola* exudates.

Materials and Methods

Plant material

Twenty rubber clones (Table 1) and 191 genotypes from a biparental family were used in this study. Among the 20 clones, 13 were bred from the so-called Wickham population (i.e. the seeds historically transferred from Brazil to Kew Gardens in UK by Sir Wickham, in 1876), in Asia (GT1, PB217, PB254, PB260, RRIC100, RRIM600, RRIM901 and RRIM926) and Africa (IRCA18, IRCA19, IRCA303, IRCA41 and IRCA631). Seven clones (FDR4575, FDR5788, FDR5240, FDR5665, MDX607, MDX624 and CD1174) were bred in Latin America by crossing Wickham and native Amazonian parents. All clones were of the *Hevea brasiliensis* species except FDR5240 which was obtained by interspecific crossing (*H. brasiliensis* x *H. spruceana*).

Eighteen clones (all clones listed in Table 1, except IRCA18 and IRCA631), grown at the SAPH (“Société Africaine de Plantations d’Hévéa”) plantation of Toupah, in Ivory Coast, were used for toxicity tests. Although initially selected for their good yield in rubber production, IRCA18 and IRCA631 were later found highly sensitive to the CLF disease in

Africa and thus removed from the recommendation lists. They were no longer available at the SAPH-Toupah plantation.

Eight clones (IRCA41, GT1, RRIM600, RRIC100, PB217, IRCA18, PB260, and IRCA631), grown in a greenhouse (26/28°C night/day temperature and 40-60 % humidity) at Cirad, Montpellier (France), were used for both inoculation and filtrate toxicity tests. In this experiment, they were chosen for their contrasted sensitivity to CLF in African plantations, with GT1 and IRCA41 the least sensitive, on the one hand, and IRCA18 and IRCA631 the more sensitive, on the other hand.

For genetic mapping and QTL analysis, the biparental population PB260 x RRIM600 was produced in Vietnam at the Lai-khê experimental station of the Rubber Research Institute of Vietnam, by hand pollination. The seeds were sent to the Côte d'Ivoire, and 191 genotypes taken at random were multiplied by budding at the highlySOGB plantation ("Société de Grand-Béréby"). The male parent (RRIM600) is more tolerant to CLF than the female parent (PB260), in African plantations.

The clonal identities of all the plants were checked using a set of eight microsatellite (Simple Sequence Repeats, or SSR) markers.

Fungal material

The ten *C. cassiicola* isolates used in this study were collected from rubber trees in Asian or African plantations (Table 2). They were isolated from single conidium and verified by sequencing of the PCR-amplified fragments of the ribosomal genes using ITS1 and ITS4 primers [27]. Their genetic group and toxin class were characterized by amplicon sequencing of four combined loci (ITS, actin, *caa5*, *ga4*) and the cassiicolin-encoding gene respectively, according to the typology proposed by Déon *et al.* [10]. The mycelium was cultivated on PDA medium (Potato Dextrose Agar), at 25 °C in the dark. For long term conservation, mycelial plugs were kept at -80 °C in 20 % glycerol. For filtrate production, 100 ml of modified Czapeck medium [7] was inoculated with 6 mycelial plugs (5 mm diameter) from a 7-days-old culture on PDA medium at 25 °C (photoperiod 12 h); the mycelium was grown in Czapeck medium for 21 days, at 25 °C (photoperiod 12 h). The culture was filtered once through 0.45 µm Millipore membranes to remove most of the mycelium, then twice through 0.22 µm Millipore membranes. The last filtration was conducted under sterile laminar flow. The sterile filtrate was stored at 4 °C, for up to three months.

Cassiicolin purification

Cassiicolin (isoform Cas1) was extracted from 1 L of culture filtrate from the isolate CCP, following the protocol in acidic conditions described previously [7]. The toxicity of the fractions was monitored by visual assessment of the symptoms (necrosis) on PB260 detached leaflets. The purified toxin was conserved dried (lyophilized) for years or diluted in water, at 4 °C, for at least three months

Table 1. Rubber clones used in this study

Clone ¹	Parentage (Female x Male)	Genetic group ²	Origin
CD1174	AVROS1581 x MDF315	WA	Cirad Michelin Selection, Guatemala
FDR4575	HARBEL68 x FDR18	WA	
FDR5240	HARBEL68 x TU45/525	WA	
FDR5665	HARBEL62 x MDX25	WA	
FDR5788	HARBEL8 x MDF180	WA	
MDX607	AVROS1581 x MDF?	WA	
MDX624	AVROS1581 x MDF?	WA	
GT1	Primary clone	W	Gondang Tapen, Indonesia
IRCA18	PB5/51 x RRIM605	W	IRCA, Côte d'Ivoire
IRCA19	PB5/51 x RRIM605	W	
IRCA303	GT1 x IR22	W	
IRCA41	GT1 x PB5/51	W	
IRCA631	PB5/51 x RRIM707	W	
PB217	PB5/51 x PB6/9	W	Prang Besar, Malaysia
PB254	PB5/51 x PBS/78	W	
PB260	PB5/51 x PB49	W	
RRIC100	RRIC52 x PB86	W	RRIC, Sri Lanka.
RRIM600	TJIR1 x PB86	W	RRIM, Malaysia
RRIM901	PB5/51 x RRIM600	W	
RRIM926	PB5/51 x RRIM623	W	

¹ All clones are of the *H. brasiliensis* species, except FDR5240 clone which is of an interspecific hybrid (*H. brasiliensis* x *H. spruceana*).

² Genetic group: W (Wickham) genotypes originate from seeds historically transferred from Brazil to Kew Gardens (UK) by Sir Wickham in 1876 and then improved and multiplied in Asia and Africa; WA genotypes were created by crossing between W and A (native Amazonian) genotypes.

Table 2. Treatments used in this study.

Blank treatments		
CZ	Culture medium	
Tox0	Water	
Purified cassiicolin Cas1 ¹	Concentration	
Tox1	1 ng/μL	
Tox5	5 ng/μL	
Tox10	10 ng/μL	
<i>C. cassiicola</i> filtrates	Isolate type ²	Geographical origin
CCP	C/Cas1	Philippines
CCAM3	C/Cas1	Cameroon
CLN16	A4/Cas0	Malaysia
CIND3	A4/Cas0	India
CSRi5	A4/Cas0	Sri-Lanka
CCI6	A4/Cas0	Ivory Coast
CCI13	A4/Cas0	Ivory Coast
TSB1	B4/Cas5	Malaysia
CSB16	B4/Cas5	Malaysia
CTHA3	F1/Cas0	Thailand

¹ Cassiicolin (isoform Cas1) purified from isolate CCP culture filtrate

² Genetic group/toxin class, as characterized by Déon *et al.* [10]

Toxicity test

The various treatments assessed for toxicity are listed in Table 2. They include crude culture filtrates from 10 *C. cassiicola* isolates of various types and geographical origins, the cassiicolin isoform Cas1 purified from isolate CCP, at three concentrations (Tox1, Tox5, Tox10), and two blank treatments (water and Czapeck culture medium). The phytotoxicity was assessed on detached rubber tree leaflets by conductivity measurement of the induced electrolyte leakage, as conducted in several ecophysiological studies on rice [28], tomato [29] or rubber [30]. Healthy leaves collected in the morphogenetic stage C (limp, brownish to green) [31] were placed in large square Petri dishes, on wet paper. Two drops (15 μL each) of each treatment solution (table 2) were applied on the abaxial surface of each leaflet after gentle scraping of the lower epidermis (1 mm²). The Petri dishes were kept in the dark at 26 °C for 48 h. Then two leaf disks (2.2 cm²) per leaflet were punched out using a cork borer, at the drop application point, and soaked in 5 mL of autoclaved distilled water in glass tubes, for 24 h, in the dark, at 26°C.

The conductivity of the solution (C₁, in μS/cm), indicating the response of the rubber leaf sample to the treatment, was measured using the conductivity meter 3310 (WTW,

Weilheim, Germany) and the conductivity cell TetraCon^R 325. Then the tubes containing the solutions with the two leaf disks were autoclaved for 15 min at 121 °C and 212 kPa. After autoclaving, the conductivity of the solution was measured again (C_2 , in $\mu\text{S}/\text{cm}$). C_2 appeared to be close to the maximum conductivity value measurable for each sample: it was checked that repeating the autoclave process one more time did not increase the C_2 value. The percentage of electrolyte leakage induced by each treatment (EL%) was calculated as $(C_1/C_2)*100$. The normalization of C_1 by C_2 aims at correcting the leaf samples' intrinsic variability in their capacity to release electrolytes, in the conditions of our test.

At least three biological replicates were performed for each clone/treatment combination. Each biological repeat was conducted by a single operator in order to analyze the operator-dependent variations (such as variations in the leaf epidermis scraping) as a block effect. The sensitivity of a clone to a specific treatment was estimated to be low for an average %FE value below 30, moderate between 30 and 60, and high above 60.

Inoculation

Inoculations were performed with two *C. cassiicola* isolates (CCI13 and CCP) on detached leaflets of eight clones (GT1, PB217, PB260, RRIC100, RRIM600, IRCA18, IRCA41 and IRCA631) maintained in greenhouse at Montpellier. Isolate CCP was chosen for its high aggressiveness [6,10]; CCI13 was a newly sampled local isolate from Ivory Coast, chosen among the widely distributed type A4/Cas0 isolates. The isolates were cultivated on PDA medium at 25 °C for four days in the dark, then three days under alternate light to stimulate sporulation, as adapted from Chee *et al* [32]. The conidia were collected and resuspended in sterile water supplemented with 0.02 % Tween20 at a concentration of 10^4 conidia mL^{-1} . Six to eight drops of each conidial suspension (20 μL per drop) were applied to the abaxial surface of detached rubber tree leaflets in the developmental stage C. The leaflets were maintained in a moist environment at 25 °C for 24 h in the dark and then for 72 h under alternate light (photoperiod 12 h). The necrotic area was measured by ImageJ software from the photo taken four days post-inoculation.

Genotyping with SSR markers

The 191 individuals from the biparental family PB260 x RRIM600 were genotyped with SSR (Simple Sequence Repeats, or microsatellites) molecular markers from rubber tree, including 300 markers from SSR-enriched genomic libraries and 92 markers from SSR-

containing EST (Expressed Sequence Tag) or SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) cDNA sequences [33-35]. For each SSR marker, one of the two framing primers was tailed with a short M13 DNA sequence in order to attach a fluorochrome during the preparation of the PCR mix. All primer sequences are available from previous publications [34,35]. Genomic DNA from each individual was extracted from fresh leaves of young plants according to Risterucci *et al.* [36] and quantified by fluorescence (Fluorochrome Hoechst 33258). Each PCR amplification was performed in a 10 μ L reaction solution containing 25 ng of DNA, 2 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP, 1.0 U Taq DNA polymerase, 1.0 x PCR buffer, and 0.2 μ M of each primer, with molecular biology grade water up to 10 μ L. The program for PCR was denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 10 cycles of denaturation (94 °C for 45 sec), annealing (55 °C for 1 min for the first cycle), and elongation of the second strands (72 °C for 75 sec), reducing the annealing temperature by 0.5 °C per cycle starting at 55.0 °C and down to 50.5 °C; then 25 cycles were carried out with an annealing temperature of 50 °C (94 °C for 45 sec for denaturation and 72 °C for 1 min for elongation). A final elongation step was performed at 72 °C for 5 min. Amplicons were migrated by capillary electrophoresis on ABI3500xL equipment and the migration images analyzed by Genemapper software (Applied Biosystems 2007).

Statistical analysis, linkage map construction and QTL mapping

Statistical analyses were performed with software R (version 3.0.3). Analyses of variance were performed with linear models using Rcmdr and lme4 packages. The correlation between variables was calculated by Pearson correlation coefficient using Rcmdr package.

In the study of the responses of 18 clones (all clones in Table 1, except IRCA18 and IRCA631) to 15 treatments (Table 2), the blocks, the clones, and the treatments were considered as fixed effects; the mean values were calculated by Lsmeans package, and the significance of differences was tested using Student-Newman-Keuls (SNK) test (at risk $\alpha=0.05$, unless specified). On the matrix data of the global effects of the clone x treatment combination, a double clustering was carried out by use of the function heatmap.2 of gplots package, based on Euclidean distances and on hierarchical clustering using the “complete linkage” aggregation method.

Broad-sense heritability estimation (H^2) for the trait of sensitivity to the different toxic treatments was calculated using the following formula: $H^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_e^2/n)$, where n is the

mean number of replicates per genotype, σ_g^2 is the estimated genetic variance (*i.e.* inter-genotype variance), and σ_e^2 the residual error variance.

Linkage map construction was performed with the software JoinMap 4.1 [37] using a regression mapping algorithm [38] and the genetic distance function of Kosambi. QTL analysis was performed using the software MapQTL 6.0 [39]. A permutation test [40] was applied with 1000 rounds to determine the significance threshold of the LOD score (logarithm (base 10) of odds, [41]) for QTL detection. The Interval Mapping (IM) method [42] was initially implemented, then the markers nearest to the first detected QTL were taken as co-factors so as to run a multiple-QTL (MQM) analysis [43,44] with the aim to detect other QTL of smaller importance. Each QTL was characterized by its LOD score (significance level), its most probable position on the genome, its percentage of explanation of the phenotypic variance (R^2), and the effects of the parental alleles involved in its expression.

Assessment of allelic effects on the QTL expressions

For any individual of the population, each QTL expression results from the addition of the three following effects: effect of the allele from the female parent, effect of the allele from the male parent, and interaction between both alleles. These effects can be estimated at the position of the nearest marker in the neighborhood of the most probable QTL position, where the allelic constitutions of the individuals of the population are completely known. If the segregation ratio of the marker is 1:1:1:1, the variance analysis of the phenotypic data of one trait can provide an estimation of the parental effects (two alleles per parent equivalent to two levels of treatment), and of the interaction between both parents for this trait. For a marker with a segregation ratio 1:1 with only one polymorphic parent, only the effect of this parent can be tested. This method was used in order to assess the allelic effects of the QTL detected for the different toxicity tests applied to the population.

Results

Methodological validation of the toxicity test

The toxicity test was first validated using the purified toxin Cas1 (cassiicolin), secreted by the *C. cassiicola* isolate CCP, on the rubber clones GT1 and PB217 known to be respectively tolerant and susceptible to this isolate [6,9,45]. Under these conditions, the test appeared to be both quantitative, with EL% values proportional to the concentration in toxin

(Fig 1A), and qualitative, with EL% values in good coherence with the known susceptibility of the clones (Figs 1A and B). On the same data set, the optimum duration for the incubation of the toxin on the leaf tissue was estimated to be 48 h, for both clones (Fig 1B), with high median EL% values and a strong dispersion of the data reflecting the various responses to the four toxin concentrations. A 24 h incubation appeared insufficient, especially for tolerant clones such as GT1. With a longer incubation (72 h), the dispersion and maximum EL% values were lower, suggesting that some of the released electrolytes were no longer measurable, having probably passed through the cuticle of the upper epidermis, degraded by the prolonged action of the toxin. A 48 h incubation is therefore recommended for routine analysis.

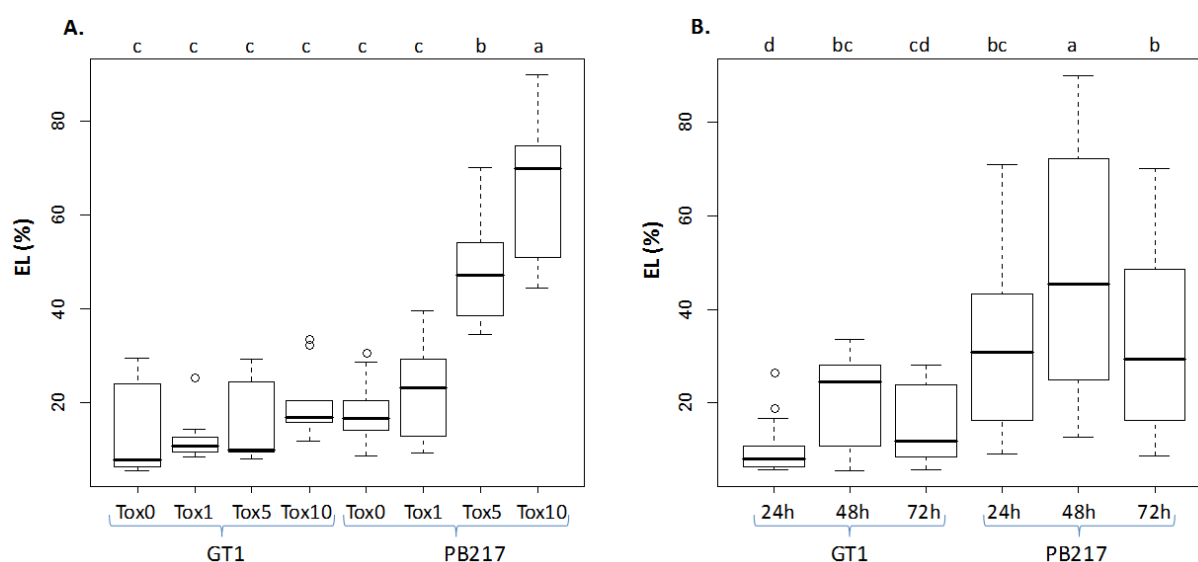


Fig 1. Effect of toxin concentration (A) and incubation duration (B). Distribution of the electrolyte leakage data (EL%) measured from leaf tissues treated with the purified toxin Cas1 at 0, 1, 5 and 10 ng/ μ L (Tox0, Tox1, Tox5 and Tox10 respectively) and three incubation durations (24, 48 and 72 h), on the clones GT1 (tolerant) and PB217 (susceptible). Three biological repeats were performed for each condition. Top letters indicate the significance of the differences between treatments (SNK test, risk $\alpha=0.05$).

As shown in Fig. 2, the EL% values measured at increasing distance (positions n1, n2 and n3) from the toxin application point (n0) were not significantly different from the untreated control, whatever the concentration in toxin, suggesting a limited diffusion of the toxin through the leaf tissue. Only the leaf pieces collected at the application point (n0) gave EL% values in good correlation with the concentration in applied toxin, *i.e.* representative of the leaf sensitivity to the toxin.

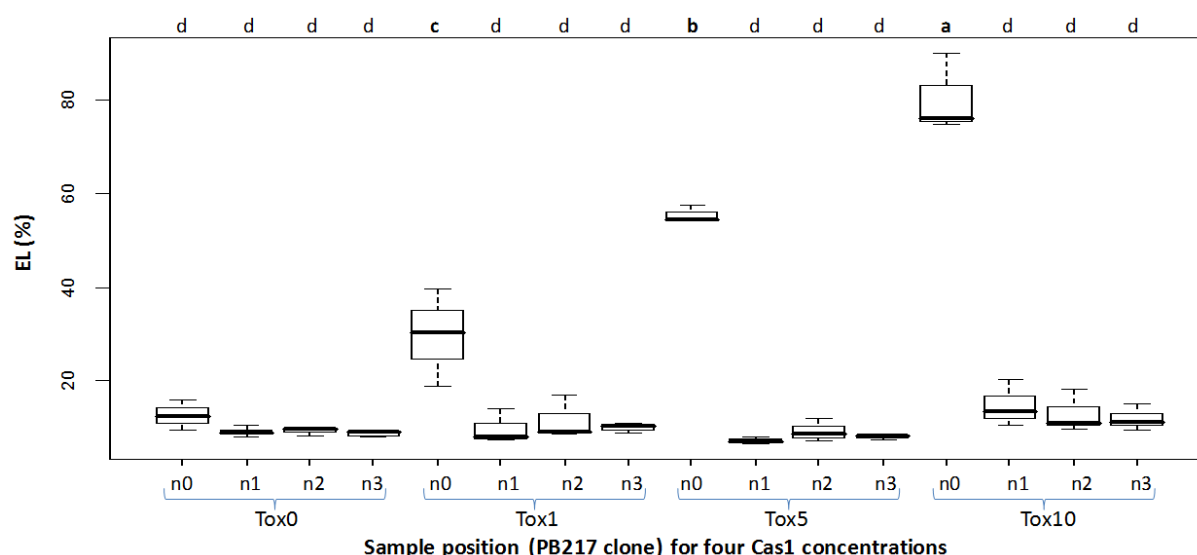


Fig 2. Extent of toxin diffusion through the leaf tissue. Distribution of the electrolyte leakage data (EL%) measured from detached leaves (susceptible clone PB217) treated with purified cassiicolin Cas1 at 0, 1, 5 or 10 ng/μL (Tox0, Tox1, Tox5, Tox10 respectively) depending on the distance from the toxin application point. After incubation for 48h, leaf pieces (2.2 cm²) were cut out at the application point (n0) or at adjacent positions of increasing distances (2, 4, 6 cm, corresponding to positions n1, n2 and n3 respectively) from n0. For each condition, three biological repeats were performed. Top letters indicate the significance of differences between treatments (SNK test, risk $\alpha = 0.05$).

The toxicity test was finally validated by comparing the response of eight clones to either the culture filtrate (fungal exudates) or the fungus itself inoculated as conidial suspension, for two isolates, CCP and CCI13 (Fig 3 and S1 Table). Overall, a positive correlation was observed between the two methods: among the 16 couples of data, 89 % (R^2) of the variation of the leaf necrosis areas due to the conidial inoculations was predicted by the results from the toxicity tests, which is equivalent to a correlation coefficient of 0.94 (significant threshold $r = 0.62$ for $df = 14$ at risk $\alpha = 0.01$) (Fig 3). Considering each isolate separately, the coefficients of Pearson correlation between the two variables (EL% and necrosis area) were 0.97 and 0.84, for CCP and CCI13 respectively (S2 Table).

Phenotyping of 18 clones for their sensitivity to *C. cassiicola* exudates, by electrolyte leakage measurement (ELM).

Eighteen clones were tested for their sensitivity to 15 treatments (Table 2): two blank treatments (water and the culture medium CZ), the purified toxin Cas1 at three concentrations, or crude culture filtrates from various *C. cassiicola* strains (seven Asian and three African), representative of four types (genetic group/toxin class) based on the previously established typology [10]. Sensitivity was monitored by EL% measurement (Table 3).

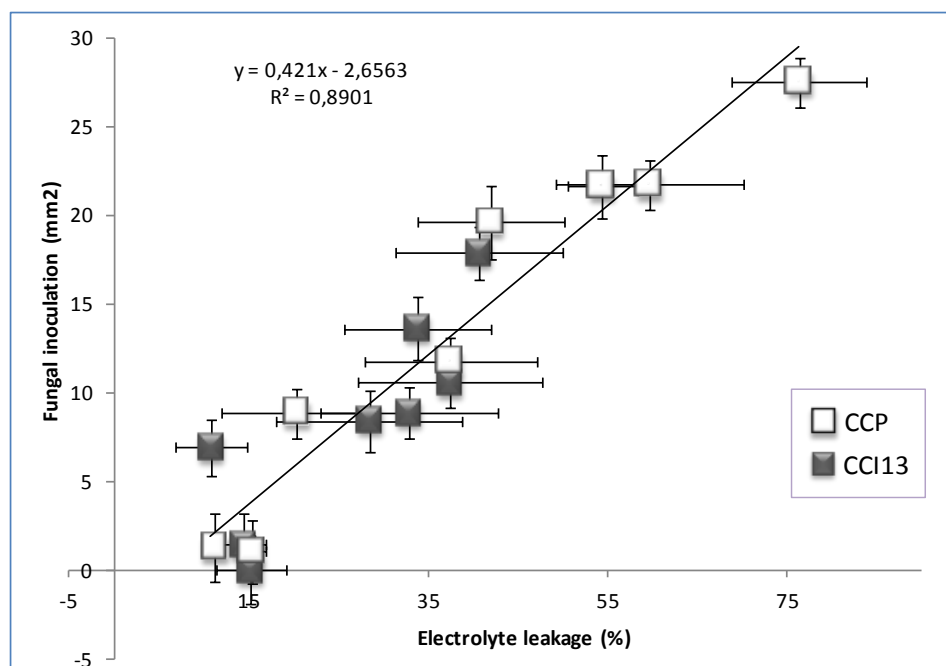


Fig 3. Correlation between the sensitivity of rubber clones to culture filtrates and their susceptibility to spore inoculation. Eight clones (GT1, PB217, PB260, RRIC100, RRIM600, IRCA18, IRCA41 and IRCA631) were treated with culture filtrates or spore suspensions from two isolates (CCP and CCI13), on detached leaves. Sensitivity to the culture filtrates was expressed as the induced electrolyte leakage EL%. Susceptibility in response to spore inoculation was expressed as the surface of leaf necrosis. The error bars are standard errors over three biological repeats. See S1 Table for details.

Among the 270 clone x treatment combinations, EL% varied from 11.2 to 95.5 %, with the general mean equal to 45.6 % (Table 3). The clones were ranked based on their mean response to the 15 treatments, from the more sensitive (PB260, RRIM926 and FDR4575) to the less sensitive (FDR5240, IRCA41, RRIM600). The treatments were ranked based on their mean effect on the 18 clones, from the least aggressive (Tox0 and Cz) to the most aggressive (CCI6). When focusing on the responses induced by the purified cassiicolin Cas1 (grey columns in Table 3), we could observe that the mean intensity of the response was proportional to toxin concentration. The toxicity measured for the CCP filtrate (from which cassiicolin was purified) was intermediate between the responses obtained with 5 and 10 ng/ μ L of purified toxin.

Table 3. Electrolyte leakage response (EL%) of 18 clones to *C. cassicola* exudates (15 treatments).

Treatment Clone	Tox0 Water	Cz Culture medium	Tox1 Cas1 (1ng/μL)	CTHA3 F1/Cas0	CLN16 A4/Cas0	TSB1 B4/Cas5	CSB16 B4/Cas5	CIND3 A4/Cas0	Tox5 Cas1 (5ng/μL)	CCAM3 C/Cas1	CCP C/Cas1	CSRI5 A4/Cas0	CCI13 A4/Cas0	Tox10 Cas1 (10ng/μL)	CCI6 A4/Cas0	Mean per clone
FDR5240	12.0	13.8	18.1	19.9	19.0	25.4	17.5	17.8	30.3	21.3	14.1	22.8	21.8	25.2	37.0	21.1 ^{fg}
IRCA41	13.2	11.2	19.7	21.9	25.6	16.7	22.2	29.0	35.0	38.6	33.2	12.6	34.6	43.1	15.2	24.8 ^{fg}
RRIM600	20.7	17.5	20.3	22.4	29.1	29.5	34.2	34.6	28.9	41.0	29.9	42.4	42.1	28.8	35.9	30.5 ^f
FDR5665	17.3	21.0	30.2	19.5	36.7	29.7	25.1	47.1	27.6	42.4	47.7	48.5	55.6	43.7	63.7	37.1 ^e
MDX624	21.2	20.4	16.2	21.2	28.4	26.4	22.8	40.8	38.2	54.7	44.9	55.4	61.5	44.4	86.8	38.9 ^{de}
CD1174	23.6	23.4	17.2	22.4	29.1	27.1	35.3	35.7	21.8	55.2	43.3	73.1	78.0	40.6	78.1	40.3 ^{cd}
RRIC100	19.1	18.3	25.2	26.7	36.5	30.9	48.3	38.8	54.3	55.2	36.5	60.2	49.0	82.8	44.5	41.8 ^{cd}
MDX607	24.2	27.2	37.2	44.7	37.8	21.4	33.8	36.7	45.6	43.1	48.7	61.6	41.7	79.2	74.5	43.8 ^{cd}
IRCA303	29.5	39.0	44.4	64.4	29.0	49.9	51.2	40.0	33.2	41.6	43.5	47.2	45.2	46.3	74.2	45.2 ^c
PB217	18.7	24.9	45.3	44.9	41.5	46.8	40.7	42.7	63.9	44.5	71.1	41.0	42.3	76.3	42.5	45.8 ^c
IRCA19	15.3	21.0	52.7	18.4	28.7	23.1	34.0	34.7	71.9	53.7	81.7	49.6	51.5	89.3	62.8	45.9 ^c
PB254	21.8	25.0	55.3	38.1	32.7	44.1	61.0	47.1	87.1	51.0	84.1	45.1	56.6	88.2	56.6	52.9 ^b
GT1	46.0	59.6	37.2	54.6	46.2	49.7	61.4	60.9	47.1	57.2	40.1	63.0	66.0	61.2	58.2	53.9 ^b
RRIM901	16.8	27.4	27.9	36.8	54.1	39.4	31.9	39.9	68.7	78.8	65.5	94.5	80.0	64.1	90.5	54.4 ^b
FDR5788	17.8	16.3	29.4	28.4	38.6	43.0	44.3	41.7	69.7	86.5	82.1	69.6	78.2	86.8	90.4	54.9 ^b
FDR4575	37.4	42.6	45.3	43.0	45.0	55.7	50.5	53.5	54.4	69.4	72.1	92.5	95.5	72.6	93.3	61.5 ^a
RRIM926	13.8	19.7	42.3	47.1	43.5	53.7	48.4	68.9	78.3	84.1	89.4	90.8	93.5	77.4	93.7	63.0 ^a
PB260	13.9	44.2	51.6	43.1	53.5	62.0	69.6	63.3	63.2	81.4	80.7	85.0	87.6	94.6	88.1	65.5 ^a
Mean per treatment	21.2 ^h	26.3 ^h	34.2 ^g	34.3 ^g	36.4 ^{fg}	36.5 ^{efg}	40.7 ^{ef}	43.0 ^e	51.1 ^d	55.6 ^{cd}	56.0 ^{cd}	58.6 ^{bc}	60.0 ^{bc}	63.6 ^{ab}	65.9 ^a	

The 15 treatments were the purified cassiicolin Cas1 at 1, 5 and 10 ng/μL (Tox1, Tox5, and Tox10 respectively, grey columns), filtrates from 10 isolates (with the genetic group/toxin class indicated under the isolate name) and two blank treatments, *i.e.* water (Tox0) and the culture medium Cz. For each clone x treatment combination, the EL% value is the mean from at least three biological replicates. The significance of the clone and treatment effects (superscript letters associated with the mean per clone and mean per treatments values) was estimated separately for each effect using the SNK test (risk $\alpha=0.05$).

In the variance analysis applied to the whole data set (Table 4), the effects due to the clones and the treatments as well as the clone x treatment interaction were highly significant ($p < 0.001$). The sums of squares of these three factors (clone, treatment, interaction) were of the same magnitude, thus indicating that they were roughly equivalent in their contributions to the explanation of the data variations. The statistical model explained $R^2 = 75\%$ of the total variation. Fig 4 shows the heatmap response for the whole EL% data set, and the hierarchical clustering (by pairwise dissimilarities) of the clones (Cl), on left side, and treatments (Tr), on top. Concerning the treatments, two main clusters were identified. Cluster Tr1 corresponds to the eight treatments of low mean toxicity (Tox0, Cz, CLN16, Tox1, CTHA3, CIND3, TSB1, and CSB16), with one sub-cluster corresponding to the two blank treatments Tox0 and Cz. Cluster Tr2 corresponds to seven treatments of high mean toxicity and is divided into two sub-clusters: CCP and the related Tox5 and Tox10 treatments on the one hand, and CCI6, CCAM3, CSRI5, and CCI13 on the other hand. Concerning the clones, two main clusters were also identified. Cluster Cl1 corresponds to 10 clones highly sensitive to Tox10. Within Cl1, five clones (PB260, RRIM926, FDR4575, FDR5788 and RRIM901) were highly sensitive to all Tr2 treatments, while the responses of the others clones were more diverse: RRIC100 was highly sensitive to Tox10 only; MDX607 was highly sensitive to Tox10 and CCI6; and the other three (PB254, PB217, IRCA19) were highly sensitive to Tox10 (and related motifs Tox5 and CCP) but clearly less to the other Tr2 treatments. Cluster Cl2 corresponds to eight clones of variable sensitivity but clearly less sensitive to Tox10, Tox5 and CCP, compared to the clones in Cl1. Two clones in Cl2 (MDX624 and IRCA303) were highly sensitive to CCI6.

Table 4. ANOVA of the EL% response of 18 clones to 15 treatments.

Component	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
block	2	2961	148.5	6.8	0.0012**
clone	17	125258	7368.1	33.8	< 2.2e-16***
motif	14	149761	10697.2	49.1	< 2.2e-16***
clone:motif	238	121375	510	2.3	< 2.2e-16***
Residuals	614	133823	218.0		

The 15 motifs were the purified cassiicolin Cas1 at 1, 5 and 10 ng/ μ L (Tox1, Tox5 and Tox10 respectively), 10 filtrates and two blank treatments, water (Tox0) and the culture medium Cz. $R^2 = 0.75$; '**' $p < 0.01$; '***' $p < 0.001$

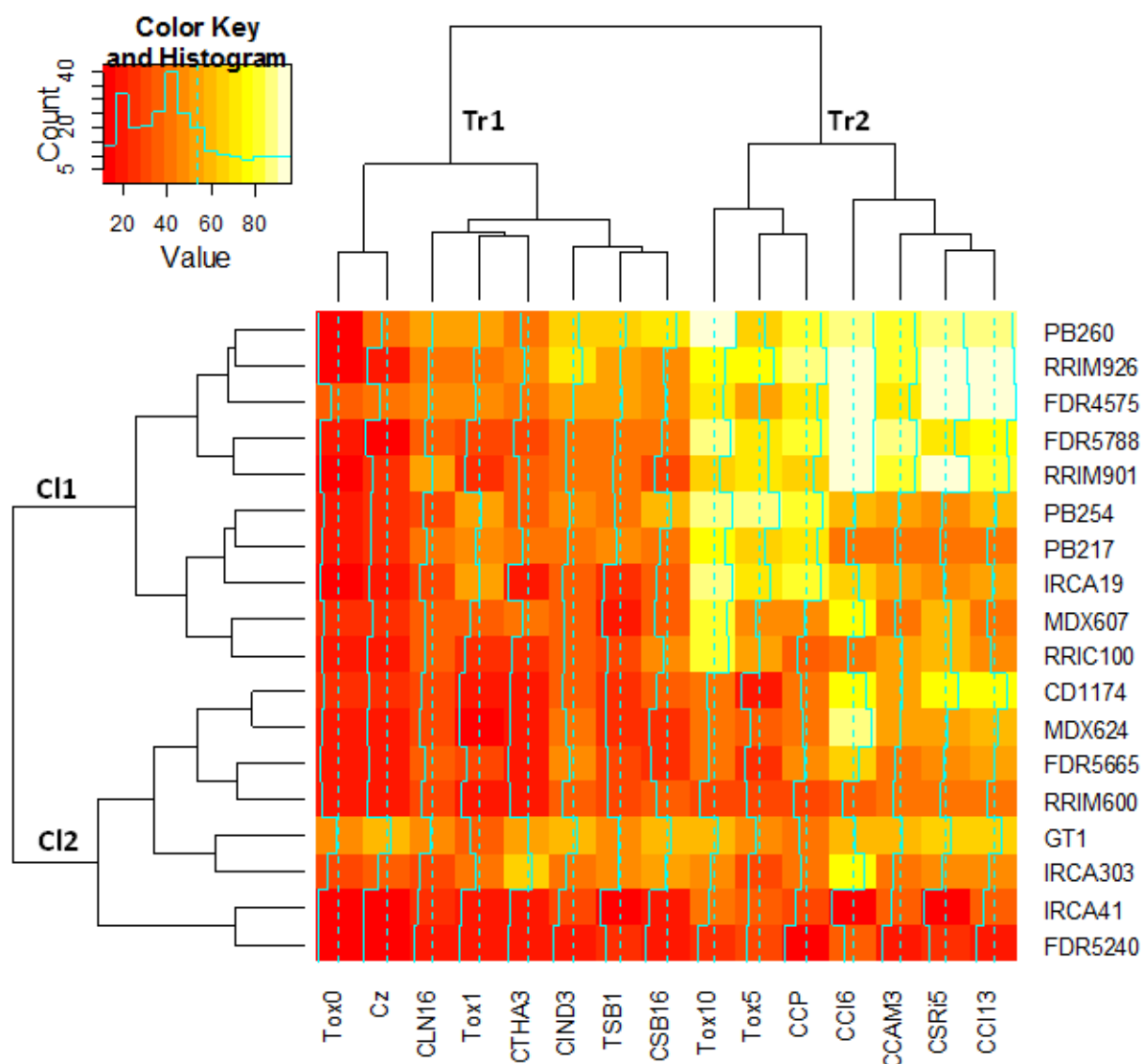


Fig 4. Electrolyte leakage response of 18 clones to 15 treatments: matrix of the EL% data from Table 3 and hierarchical clustering. Hierarchical clustering of the 18 clones (CI) and 15 treatments (Tr) was performed by the “complete linkage” aggregation method from Euclidian distances. Color key from dark to light colors indicates low to high EL% values.

Identification of QTL associated with the response of rubber tree to *C. cassiicola* exudates

A genetic linkage map was built from the F1 progeny of the PB260 x RRIM600 cross using microsatellite markers (SSR) exclusively. A subset of 191 progenies planted in the Côte d’Ivoire was screened with 392 SSR markers, among which 306 segregated. Table 5 shows the five possible classes of segregation with the number of markers in each group. The Mendelian segregation ratios were in accordance with a diploid inheritance of most markers, with only seven markers (2 %) showing some segregation distortion. Eighteen linkage groups

were found, corresponding to the 18 chromosomes of the haploid rubber tree genome (Fig 5). The overall coverage was of 2005 cM, with an average intermarker distance of 6.6 cM.

Progenies were phenotyped using the ELM method for their sensitivity to the purified toxin Cas1 at 5 ng/μL (Tox5) or to seven *C. cassiicola* culture filtrates (CCP, CCAM3, CCI6, CCI13, CSRI5, CSB16, and TSB1) of various geographic origins and three genetic groups. The EL% values of the F1 progenies for each treatment followed normal distributions (Fig 6), indicating a quantitative response to the eight treatments. The EL% values of the parental clones were contrasted, with the maternal clone PB260 more sensitive than the paternal clone RRM600, whatever the treatment.

Analysis of the Pearson correlation coefficients between the various treatments for their effect on the progeny (Table 6) revealed a highly significant positive correlation between CCP and Tox5. All other filtrates were strongly correlated to each other but not to CCP and Tox5 (or only moderately so). The blanks (water and Cz) were significantly correlated to each other but not to any other treatment.

Table 5. Number of SSR markers segregating in the F1 progeny of the PB260 x RRM600 family, for each segregation type.

Type of segregation	Genotypes in the progeny	Mendelian segregation ratio	Number of segregated SSR markers
<abxcd>	ac, ad, bc, bd	1 : 1 : 1 : 1	38
<efxeg>	ee, eg, ef, eg	1 : 1 : 1 : 1	81
<hkxhk>	hh, hk, kk	1 : 2 : 1	36
<lmxll>	lm, ll	1 : 1	94
<nnxnp>	nn, np	1 : 1	57
<i>Total markers</i>			<i>306</i>

The 5 types of segregation, as defined by Ritter et al. [46] for crosses between heterozygous parents are coded according to JoinMap software instructions [37].

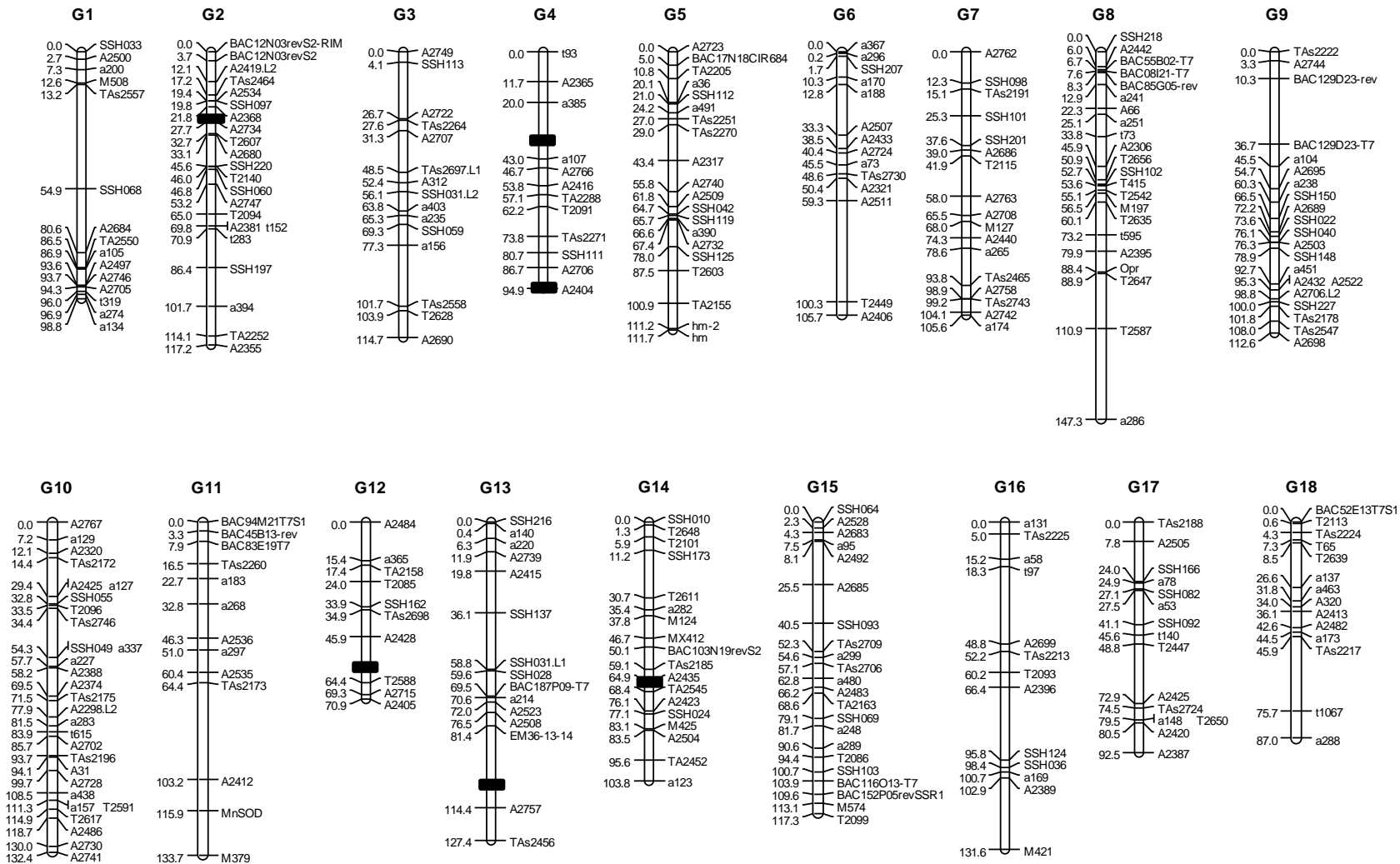


Fig 5. Genetic linkage map of rubber tree and QTL associated with the sensitivity/insensitivity to *C. cassiicola* exudates. The map was obtained from 191 F1 progenies of the PB260 x RRIM600 family. All the markers are SSR markers. The 18 linkage groups (g1-g18) correspond to the 18 chromosomes of the haploid rubber tree genome. Black boxes indicate the position of the QTL. The percentages of phenotypic variance explained by each QTL are in Table 7.

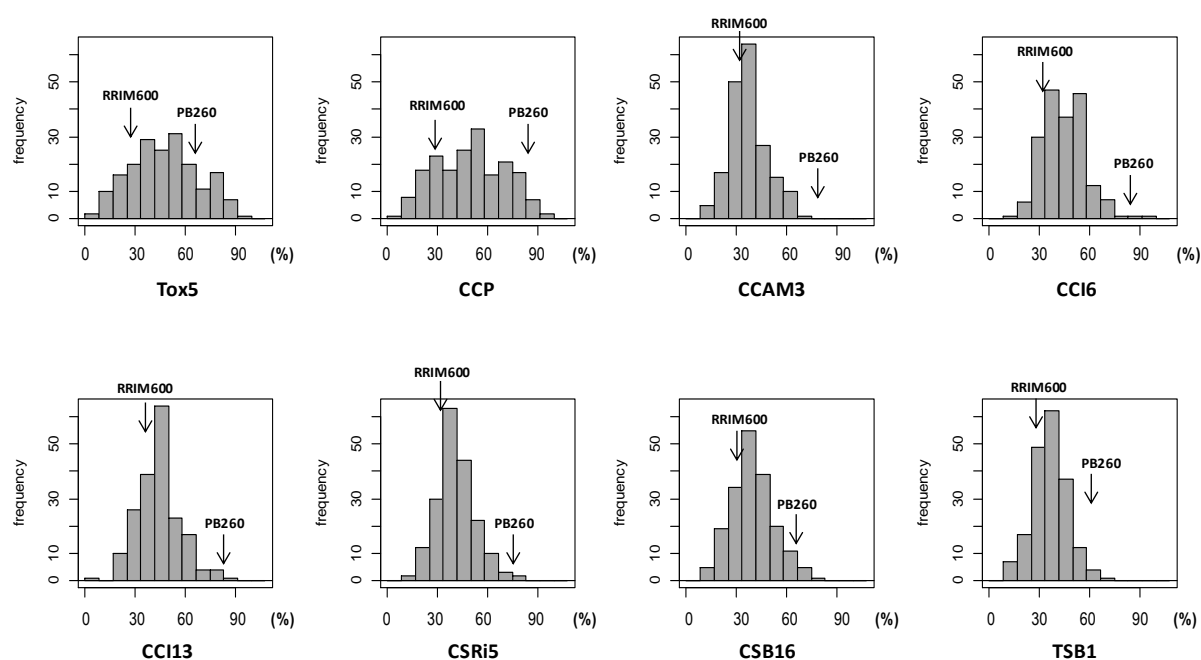


Fig 6. Distribution of the electrolyte leakage (EL%) data of the F1 progenies, for each treatment. The treatments were the purified toxin Cas1 at 5 ng/μL (Tox5) and culture filtrates from seven *C. cassiicola* isolates. Parental EL% values (PB260 and RRIM600) are indicated by arrows. Shapiro-Wilk test at risk $\alpha=0.05$.

Table 6. Pearson correlation coefficients between treatments calculated from the electrolyte leakage values (EL%) on the F1 progeny.

Treatment	Type of isolate	Tox5	CCP	CCAM3	CCI6	CCI13	CSRI5	CSB16	TSB1	Cz
CCP	C/Cas1	0.86***								
CCAM3	C/Cas1	0.18	0.25*							
CCI6	A4/Cas0	0.23	0.30*	0.70***						
CCI13	A4/Cas0	0.23	0.28*	0.72***	0.81***					
CSRI5	A4/Cas0	0.25*	0.30*	0.74***	0.75***	0.78***				
CSB16	B4/Cas5	0.09	0.13	0.64***	0.70***	0.70***	0.67***			
TSB1	B4/Cas5	0.20	0.19	0.64***	0.67***	0.63***	0.67***	0.62***		
Cz	-	0.14	0.17	0.03	-0.01	0.03	-0.03	-0.03	0.04	
Water	-	0.13	0.16	0.14	0.10	0.10	0.10	0.03	0.13	0.51***

The treatments were the purified toxin Cas1 at 5 ng/μL (Tox5) and culture filtrates from seven *C. cassiicola* isolates. Blank treatments are water and the culture medium Cz. Significance level of the correlation coefficients: '*' $p<0.05$; '**' $p<0.01$; '***' $p<0.001$

QTL associated with the response to seven filtrates or to the purified toxin Cas1 were detected from the PB260 x RRIM600 F1 progeny and mapped on the genetic linkage map (Table 7 and Fig 5). The estimated broad-sense heritability (H^2) varied between 0.44 and 0.79 for the filtrates and the toxin, with the highest values for Tox5, CCP and CSB16 ($H^2 > 0.70$).

For the two blank treatments (water and Cz), heritability was very low (between 0.007 and 0.18).

A total of six QTL were identified, with LOD scores varying from 4.8 to 7.5. For the response to Tox5 and CCP, two common QTL were detected at positions g2-26 and g4-95, with percentages of explained phenotypic variance (R^2) varying from 11 to 17 %. For the three filtrates of isolate type A4/Cas0 (CCI6, CCI13 and CSRI5), a common QTL was detected at position g4-32, explaining 11, 14 and 12 % respectively of the phenotypic variance. For filtrates CCAM3, CSB16 and CSRI5, of three different isolate types, a common QTL was detected at position g13-102, explaining respectively 11, 13 and 11 % of the phenotypic variance. A second QTL was detected for filtrate CCAM3, at position g12-53, explaining 13 % of the phenotypic variance. Finally, a single QTL was detected for filtrate TSB1, at position g14-64, which explained 16 % of phenotypic variance.

The allelic effects on QTL expression were assessed (Table 7). For the two QTL g2-26 and g4-95 associated with the Cas1 toxin and CCP filtrate, the allelic effects were tested at the position of the markers A2734 and A2404 respectively. In both cases, the effect of the female parent, due to the difference between both alleles of this parent without any detectable interaction, was highly significant and explained the larger part (21 and 22 % for Tox5 and CCP respectively) of the phenotypic variation expressed by the QTL. The effect of the male parent was also significant for QTL g2-26 but it explained a lesser part (3 %) of the phenotypic variation. There was no significant interaction between alleles from both parents. For the QTL g12-53 associated with CCAM3, located between the markers A2428 and T2588, no parental effect could be detected. For the QTL g4-32 (associated with CCI6, CCI13, and CSRI5) and g13-102 (associated with CCAM3, CSRI5, and CSB16), there was no parental effect but a highly significant effect of interaction between alleles from both parents explaining the major part of the phenotypic variation for this trait. For the QTL g14-64 associated with TSB1, there was a highly significant effect of the male parent and a significant effect of the interaction.

Table 7. Broad-sense heritability (H^2), QTL and parental allelic effects (%) calculated from the response (EL%) of the PB260 x RRIM600 F1 family to *C. cassiicola* exudates.

Treatment	Type of isolate	H^2	QTL ^a	LOD peak	R^2 (%) ^b	Closest marker ^c	Accession ^d	Segregation ratio	Parental allelic effect (%) ^e		
									PB260	RRIM600	Interaction
Tox5	C/Cas1	0.78	g2-26	7.5	17	A2734	AY486840	1:1:1:1	10***	6***	-
			g4-95	4.9	11	A2404	AY486695	1:1:1:1	11***	-	-
CCP	C/Cas1	0.78	g2-26	5.4	12	A2734	AY486840	1:1:1:1	10***	3*	-
			g4-95	5.3	12	A2404	AY486695	1:1:1:1	12***	-	-
CCAM3	C/Cas1	0.58	g12-53	5.9	13	A2428 or T2588	AY486714 or AY486764	1:1	-	-	-
			g13-102	5.0	11	A2757	AY486813	1:1:1:1	-	-	8***
CCI6	A4/Cas0	0.49	g4-32	4.9	11	a107	AY486864	1:1:1:1	-	-	8***
CCII3	A4/Cas0	0.44	g4-32	6.0	14	a107	AY486864	1:1:1:1	-	-	10***
CSRI5	A4/Cas0	0.55	g4-32	5.4	12	a107	AY486864	1:1:1:1	-	-	9***
			g13-102	4.8	11	A2757	AY486813	1:1:1:1	-	-	8***
CSB16	B4/Cas5	0.79	g13-102	5.6	13	A2757	AY486813	1:1:1:1	-	-	7***
TSB1	B4/Cas5	0.51	g14-64	7.0	16	A2435	AY486718	1:1:1:1	-	18***	3*
Water	-	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cz	-	0.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-

The PB260 x RRIM600 F1 family was treated with the purified toxin Cas1 at 5 ng/ μ L (Tox5), culture filtrates from seven *C. cassiicola* isolates and two blank treatments (water and the culture medium Cz). The measured response was the induced electrolyte leakage (EL%). QTL, calculated by Interval Mapping method, were significant at the LOD threshold of 4.2 (risk α = 0.05).

^a QTL are named by the number of the linkage group (g) on which they are located and their position

^b R^2 is the percentage of explained phenotypic variance

^c Closest SSR marker from the LOD peak

^d Accession number of the markers in EMBL databank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)

^e Significance level of the parental allelic effect: '*' $p < 0.05$; '**' $p < 0.01$; '***' $p < 0.001$

Discussion

Development and validation of a phenotyping method

We have developed an indirect phenotyping method consisting in testing the sensitivity of rubber tree clones to *C. cassiicola* exudates, as a parameter of their global susceptibility to the fungus infection. This method is derived from the leaf puncture assay described by Breton *et al.* [6]: exudates were applied as crude culture filtrates or as purified toxin (Cas1) in case of the isolate CCP, on detached rubber tree leaves. However, instead of measuring the surface of induced leaf necrosis, the impact of the exudates was quantified by Electrolyte Leakage Measurement (ELM).

The ELM method was found to be more sensitive and accurate than the simple measurement of visual symptoms. In fact, of all the filtrates tested in this study, only CCP as well as the purified Cas1 toxin extracted from CCP gave clear visual symptoms (necrosis with darkening of the veins) as early as 48 h after application. With all the other filtrates, only the conductivity method was sensitive enough to reveal some variability among the clones within this timeframe. Therefore, the ELM method is clearly more appropriate than the visual assessment for quantifying the early cellular damages induced by the fungal exudates. Another test, called the leaf-wilting test, has previously been used in assessing the effect of *C. cassiicola* toxins on detached leaves, by measuring the induced water losses: detached leaflets were placed in a glass container with the petiole tip immersed in toxin solution or culture filtrate; the leaf wilting intensity was quantified after two days as the fresh weight out of dry weight ratio, in percent of a control [6,26]. However, we found this method more prone to variability, probably owing to the risk of external contamination when used in a tropical environment, and more costly in filtrate or purified toxin.

The toxicity test based on the ELM method was found to be quantitative. Indeed, the EL% response of 18 clones to three concentrations of purified cassiicolin Cas1 (Table 3, grey columns) was significantly correlated to toxin concentration (S1 Fig.), thus confirming the observation initially made on two clones (Figs 1A and B). The test was able to reveal a large phenotypic diversity among clones and isolates, with a significant interaction effect added to these two principal effects. Owing to its practicality and rapidity, the test allows to handle a large number of individuals, and as a consequence, it is a valuable tool for genetic studies and QTL identification. Because it uses purified toxin or filter-sterilized fungal culture instead of living cultures of the fungus, it allows the exploration of the highly diverse *C. cassiicola* species without threat to the environment.

We found a high specific positive correlation between the sensitivity of eight clones to culture filtrates from two virulent strains, CCP and CCI13, measured by the ELM method, and their susceptibility to the fungus infections, tested by conidial inoculation, on detached leaves. In a previous experiment, using the leaf wilting assay to evaluate the susceptibility of 51 clones to CLF disease, Breton *et al.* also found a good correlation between sensitivity to the filtrate and susceptibility to the fungus infection [6]. However, this was tested with a single isolate (CCP). Out of seven clones (GT1, IRCA41, RRIM600, PB217, RRIC100, PB260 and IRCA631) in common between Breton's study (leaf wilting test) and our study (ELM method, S1 Table and Table 3) and tested for the same filtrate (CCP), three were found to be tolerant (GT1, IRCA41 and RRIM600) and three were sensitive (PB217, PB260 and IRCA631), in both studies. The case of RRIC100 is ambiguous since it was noted as sensitive to CCP filtrate with the leaf wilting test, but not (or weakly) sensitive with the ELM test (S1 Table and Table 3 respectively).

Since these tests were conducted on detached rubber tree leaves, they can only account for early interaction events such as the capacity of the fungus to penetrate the cells, or the recognition of fungal effectors by plant receptors as the triggering signal for disease or resistance reactions. These early events are decisive for disease occurrence. Nevertheless, late defense mechanisms able to limit the progress of the disease may also occur. Phenotyping by inoculation on whole plants would be very informative but more time consuming and risky to handle in areas of rubber production, unless limited to local isolates.

To further evaluate the potential of this *in vitro* test in predicting rubber clones susceptibility to CLF, it should be verified if the sensitivity to culture filtrates or purified fungal toxin correlates with field susceptibility to the disease. In our study, the classification of eighteen clones (Fig 4) is partially consistent with their known susceptibility to CLF disease in African plantations. During the CLF epidemic in Cameroon in 1988-1992, PB260 was observed to be very susceptible, whereas IRCA19 was tolerant. In our study PB260 was sensitive to both CCP and African filtrates (strains CCI6 and CCI13), while IRCA19 was susceptible to CCP filtrate however less susceptible to the African filtrates, which may explain why this clone was observed to be tolerant in Cameroon. In 2003, a clone list describing the susceptibility/tolerance to CLF in various countries was published [47]. The clone GT1 was noted as highly sensitive in Malaysia, Indonesia and Thailand but relatively resistant in Africa and Sri Lanka; conversely, the clone PB260 was noted as tolerant in Asia but very sensitive in Africa. This had raised the hypothesis of the existence of various

pathotypes among *C. cassiicola*. We thus investigated the potential of the ELM-based toxicity test for differentiating pathotypes among the highly diverse *C. cassiicola* species.

Several studies have described the genetic diversity of the *C. cassiicola* species but the biological features associated with the various genetic races often remain unknown. The electrolyte leakage test may thus be a useful method to ascribe physiological traits to the genetic groups among the *C. cassiicola* species, even though it only concerns the early stages of infection, *i.e.* the toxicity of the exudates. We have previously proposed a classification of *C. cassiicola* isolates based on phylogenetic clusters and toxin classes defined from the cassiicolin isoform(s) detected by PCR (Cas1 to Cas6), with the toxin class Cas0 corresponding to isolates without cassiicolin gene [10]. In the present study, the tested culture filtrates were of various origins (seven Asian and three African) and representative of four different isolate types: A4/Cas0, B4/Cas5, C/Cas1 and F/Cas0. The clustering we obtained based on the matrix of EL% data (Fig 4) identified two clusters within the treatments (Tr1 and Tr2), corresponding to weakly aggressive treatments (including the blanks) and aggressive treatments respectively, but these did not clearly match the genetic types. Filtrates in cluster Tr1 are of mixed types (F/Cas0, A4/Cas0 and B4/Cas5). Filtrates in cluster Tr2 are of two types only (C/Cas1 and A4/Cas0). Among the aggressive treatments, CCP (type C/Cas1) was found to be associated with the related Tox5 and Tox10 treatments (*i.e.* the purified toxin Cas1 extracted from CCP, at medium and high concentrations). By contrast, the toxin at low concentration (Tox1) was found to be associated with the weakly aggressive Tr1 filtrates, of unrelated type, which were probably more influenced by the initial scraping of the leaflets than by the fungal exudates. An ANOVA analysis performed on the reduced dataset corresponding to Tox1, Tox5, Tox10 and CCP responses alone (S3 Table) evidenced no clone x treatment interaction, indicating similar sensitivity profiles in response to either the purified toxin or the crude CCP filtrate. These results all together evidence that Cas1 is an important effector of CCP filtrate toxicity. Within cluster Tr2, CCP was clearly separated from the other filtrates, of type C/Cas1 (CCAM3) and A4/Cas0 (CSRI5, CCI6 and CCI13). Filtrate CCAM3 was less aggressive than CCP, mostly on the clones IRCA19, PB217 and PB254, although both filtrates were of the same type. It was previously shown that the cassiicolin gene (*Cas1*) was strictly identical in both isolates (no allelic variation) but under-expressed in CCAM3 compared to CCP, in good coherence with the lower aggressiveness of this isolate [9]. In our study, the CCAM3 filtrate, putatively poor in cassiicolin, behaved like the aggressive isolates of A4/Cas0, suggesting that they may share a common effector other than cassiicolin. C/Cas1 may be considered as one

pathotype and A4/Cas0 as another, both allowing high aggressiveness but with different clonal sensitivity profiles. The Cas1 effector is probably a key element for differentiating these two pathotypes, based on both qualitative (presence/absence) and quantitative variations. However, the delineation of pathotypes in *C. cassiicola* remains unclear, since virulence in this species likely involves multiple effectors, either specific or shared by several isolates, with potential allelic variations and gene expression modulations.

QTL associated with the response of rubber tree to *C. cassiicola* exudates

We present in this study a saturated genetic linkage map obtained from the rubber tree family PB260 x RRIM600 using SSR markers only. The total map length (2005 cM), average map length per chromosome (112 cM) and SSR marker order were in agreement with previously published rubber tree maps, on other families [19,22,48]. Parental maps have not been built in our work, because the colinearity between parental genomes has already been demonstrated [19]. The size of the full-sib family (191 genotypes) and the quality of the markers (2 % distorted markers only) were sufficient to build a saturated map. Although large segments without mapped markers remain, this map was dense enough for efficient detection of QTL.

This is the first study describing QTL of sensitivity/tolerance to *C. cassiicola* exudates in *H. brasiliensis*. Six QTL located on five chromosomes were detected for seven isolates of various geographical origins and genetic types, with up to two QTL per treatment and moderate percentages of explanation of the total phenotypic variance (higher than 10 % but lower than 20 %), thus demonstrating the polygenic determinism of the EL% responses in the context of our study. This result is in agreement with recent studies in barley [49,50] which identified multiple QTL associated with the sensitivity to exudates (intercellular wash fluids) from the necrotrophic pathogen *Pyrenophora teres f.sp. teres*, in good correlation with susceptibility to the corresponding isolates. However, in contrast with our results, a recent study described a monogenic resistance to *C. cassiicola*-induced target leaf spot in cucumber [51]: a recessive gene (*cca-3*) associated with the resistance was fine-mapped and found to be co-localized with a CC-NB-ARC type resistance (R) gene. One single nucleotide polymorphism (SNP) leading to amino acid change in this candidate R gene differentiates the susceptible and the resistant lines.

Plants have developed a two-tiered immune system involving the recognition of pathogen-associated molecules by receptor proteins [52-56]. A first level of defense is the

innate immune system which involves the perception of both pathogen-associated (non-self) molecular patterns (PAMPs) and danger-associated (self) molecular patterns (DAMPs), *via* surface-localized pattern recognition receptors (PRRs) [55,57]. Common fungal PAMPs are carbohydrates from the cell wall, including mannoproteins, phospholipomannan, beta-glucans and chitin, as well as enzymes such as xylanase or polygalacturonases. DAMPs are released from damaged plant tissues; they include extracellular ATP, peptides and cell wall or DNA fragments. The deployment of a set of defense mechanisms by the plant upon recognition of PAMPs or DAMPs by PRRs is known as PRR-triggered immunity (PTI). To bypass these broad spectrum defenses, pathogens deliver virulence effectors either to the plant cell apoplast, in order to block PAMP perception, or inside the cell where they interfere with PTI, resulting in susceptibility. Plants have evolved a second level of defense, triggered by the direct or indirect recognition of pathogen-produced effectors by intracellular plant receptor R proteins. This specific “gene-for-gene” interaction usually triggers a strong and rapid hypersensitive response (HR) involving host-controlled programmed cell death, which in the case of biotrophic pathogens efficiently blocks the pathogen propagation. This model is known as effector-triggered immunity (ETI) [52]. However, in the case of necrotrophic pathogens adapted to colonize dying tissues, such programmed host cell death may favor, instead of limiting, pathogen development. The model involving the interaction between a necrotrophic effector (NE) and its cognate plant receptor is known as NE-triggered susceptibility (NETS) [49,58] as opposed to the ETI. Several genes conferring sensitivity to fungal necrotrophic effectors have been characterized [59-62]. All of them are single genes encoding NB-LRR receptor-like proteins. They confer dominant sensitivity to the necrotrophic effector and dominant susceptibility to the disease in their host plant.

The culture filtrates analyzed in our study are expected to be a complex mixture including both PAMPs (carbohydrates from the cell wall, hydrolytic enzymes) and effectors (secondary metabolites, small secreted proteins). It is therefore not surprising to observe multiple QTL, reflecting multiple interactions, when using the ELM-based toxicity test. However, even the cassiicolin toxin Cas1, purified to homogeneity from filtrate CCP, generated two QTL. Although the mechanism ruling Cas1 toxicity in rubber tree has not been elucidated yet, Cas1 shares many features with already characterized necrotrophic effectors: it is a small secreted cysteine-rich protein, with no known sequence homology in other species, generating necrosis with host- and cultivar-specialized profiles [6-9]. Several hypotheses may be raised to explain the polygenic determinism of sensitivity to Cas1 in rubber tree. One may be that two receptor-like proteins are required for the recognition of the

Cas1 effector. The hemibiotrophic pathogen *Magnaporthe grisea*, infecting rice, provides examples of resistance conferred by pairs of receptor-like proteins [63]. Another hypothesis would be that Cas1 may interfere with PTI, presumably induced in that case by DAMPs as a result of leaf epidermis scrapping. It should be kept in mind that no QTL was revealed with the blank treatment (Tox0) although it similarly involved leaf scrapping. Therefore, it can be assumed that the two identified QTL are indeed associated with Cas1, potentially interfering with DAMP-triggered immunity, but not associated with wounding alone. Since PTI deploys a large set of defense mechanisms, Cas1 efficiency in interfering with PTI maybe vary among the progeny and reveal more than one QTL. Multiple QTL may reflect toxin interaction with various plant targets to disturb the normal functioning of the plant and/or detoxification processes aiming at limiting the toxin effects. As an example of toxin detoxification mechanism in maize, the Hm1 and/or Hm2 *loci* were found to encode a carbonyl reductase that detoxifies the HC-toxin, determinant of host-specificity and virulence of *Cochliobolus carbonum* [64]. Further characterization of the two cassiicolin-associated QTL regions would shed light on the plant mechanisms controlling sensitivity to this effector.

The fact that two QTL (g2-26 and g4-95) are common to both CCP filtrate and the purified cassiicolin Cas1 suggests that Cas1 is the major determinant of CCP filtrate toxicity. This was also evidenced by the response of 18 clones to CCP and three concentrations of toxin, which revealed similar sensitivity profiles whatever the treatment (Table 3 and S1 Fig). The Cas1 effector may be responsible for the high aggressiveness of isolate CCP, although we cannot exclude the existence of other effectors whose effects may be hidden by the effect of Cas1.

QTL profiles varied depending on the filtrates, suggesting the involvement of isolate-specialized toxicity factors, presumably effectors rather than PAMPs, since those are usually broadly conserved among pathogens of the same species. CCP clearly contrasts with the other filtrates as shown by the pairwise correlations between the treatments applied to the F1 progenies (Table 6) or by the clustering of the 15 treatments tested on 18 clones (Fig 4). And indeed, the two QTL associated with CCP (g2-26 and g4-95) were not shared by any other filtrate. All the other filtrates were positively correlated to each other (Table 6). QTL g4-32 may be interacting with a specific effector common to filtrates of type A4/Cas0 (CCI6, CCI13 and CSRI5). On the other hand, QTL g13-102 was detected with three isolates (CCAM3, CSB16 and CSRI5) of three different types (C/Cas1, B4/Cas5 and A4/Cas0 respectively) and may thus correspond to more general unspecific defense mechanisms.

Alternatively, multiple sensitivity/insensitivity factors such as R proteins, each interacting with specific effectors from the different isolates, may be collocated at that position. This is a likely explanation knowing that resistance gene analogs (RGAs) are frequently clusterized in plant genomes [65-68].

Finally, two QTL identified in this study were localized in the same genomic region as QTL previously found associated with the tolerance to *Microcyclus ulei*, in other families. The QTL g2-26 associated with the response to filtrate CCP and Cas1 seems co-localized with the major *M2fx* QTL detected in the family PB260 x Fx2784 [21]. The QTL g13-102 detected for the CCAM3, CSB16 and CSRI5 culture filtrates seems co-localized with the major QTL *M13-Ibn* detected in the family PB260 x RO38 [69]. However, considering the low precision of QTL localization, we do not know at this stage if common or distinct co-located factors are involved in the interaction between rubber tree and these two very different foliar pathogens (*M. ulei* being biotrophic and host-specific, while *C. cassiicola* is non biotrophic, with a large host range).

Globally, our results show that a limited number of relatively important genetic factors may be involved in the process of sensitivity/insensitivity of rubber clones to *C. cassiicola* exudates. The sensitivity alleles may come from the female parent (PB260) in the case of the main QTL identified in response to CCP or Cas1, from the male parent (RRIM600) in the case of the main QTL identified in response to TSB1, and from parental allelic interaction in the case of QTL identified in response to CCI6, CCI13, CSRI5, CSB16 and CCAM3 (Table 7).

Conclusion

The indirect toxicity test based on induced electrolyte leakage measurements seems a practical and sensitive method for monitoring the early events of *H. brasiliensis* x *C. cassiicola* interaction, taking into account the genetic diversity of *C. cassiicola* without the risk of spreading new virulent strains in the environment.

Application of this method to the phenotyping of the PB260 x RRIM600 F1 family revealed the polygenic determinism of sensitivity/insensitivity to *C. cassiicola* exudates in this rubber tree family, and more specifically to the purified cassiicolin effector. It is proposed that the combined action of PAMPs contained in the filtrates and DAMPs resulting from leaf scrapping induces PTI which is then likely modulated by specific fungal molecules such as cassiicolin or yet unknown effectors.

The ELM-based toxicity test will be a useful tool for genetic investigations involving candidate effectors as well as for early selection. However, further studies are needed to evaluate the power of this test in predicting the susceptibility of rubber clones to the natural inoculum in field conditions.

Acknowledgments

The authors would like to thank Gérald Oliver for assistance in plant maintenance in the green house, and Sébastien Ribeiro for preparing the fungal culture filtrates. They also thank Stéphane Herbette for critical discussions on the interpretation of the electrolyte leakage measurements. Finally, the authors acknowledge the SOGB and SAPH plantations for their important logistic assistance in field experiments in Côte d'Ivoire.

Funding statement

This research was supported by IFC (“Institut Français du Caoutchouc”), the companies Michelin (<http://www.michelin.com/>), SIPH (“Société Internationale de Plantations d’Hévéa”, <http://www.siph.com/>) and SOCFIN (<http://www.socfin.com/>) and RRIV (“Rubber Research Institute of Vietnam”, <http://rriv.org.vn/>). The plantations SOGB (“Société de Grand Béréby”, belonging to the SOCFIN group) and SAPH-Toupah (“Société Africaine de Plantation d’Hévéa”, belonging to the SIPH group), provided access and logistic assistance for field and lab experiments in Côte d'Ivoire. RRIV provided an allocation to TDM and contributed to the creation of the family analyzed in this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, other than those stated above. All funders have read the manuscript and agreed for its publication.

References

1. Hora Júnior BTd, de Macedo DM, Barreto RW, Evans HC, Mattos CRR, et al. (2014) Erasing the Past: A New Identity for the Damoclean Pathogen Causing South American Leaf Blight of Rubber. PLoS ONE 9: e104750.
2. Deighton F (1936) A preliminary list of fungi and diseases of plants from Sierra Leone. Kew Bulletin 397-424.
3. Ramakrishnan T, Pillay P (1961) Leaf spot of rubber caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. Rubber Board Bulletin 5: 52-53.
4. Newsam A (1961) Plant Pathology Division Report. Kuala Lumpur, Malaysia: Rubber Research Institute of Malaysia. 63-70 p.
5. Liyanage ADS, Jayasinghe CK, Liyanage NIS, Jayaratne AHR (1986) *Corynespora* leaf spot disease of rubber (*Hevea brasiliensis*) - a new record. J Rubber Res Inst Sri Lanka 65: 47-50.

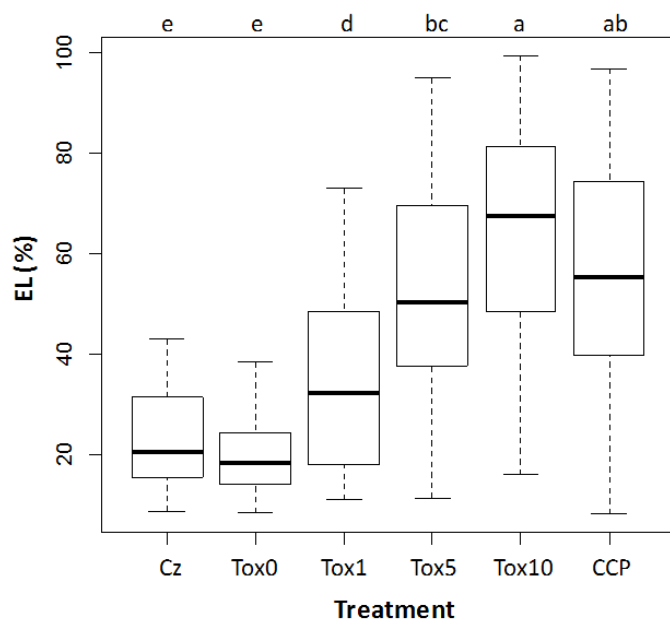
6. Breton F, Sanier C, d'Auzac J (2000) Role of cassiicolin, a host-selective toxin, in pathogenicity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of a leaf fall disease of Hevea. J Rubber Res 3: 115-128.
7. de Lamotte F, Duviau MP, Sanier C, Thai R, Poncet J, et al. (2007) Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 849: 357-362.
8. Barthe P, Pujade-Renaud V, Breton F, Gargani D, Thai R, et al. (2007) Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. J Mol Biol 367: 89-101.
9. Déon M, Bourré Y, Gimenez S, Berger A, Bieysse D, et al. (2012a) Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Plant Science 185-186: 227-237.
10. Déon M, Fumanal B, Gimenez S, Bieysse D, Oliveira RR, et al. (2014) Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. Fungal Biology 118: 32-47.
11. Silva WPK, Deverall BJ, Lyon BR (1998) Molecular, physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka. Plant Pathol 47: 267-277.
12. Atan S, Hamid NH (2003) Differentiating races of *Corynespora cassiicola* using RAPD and internal transcribed spacer markers. J Rubber Res: 58-64.
13. Silva WP, Karunanayake EH, Wijesundera RL, Priyanka UM (2003) Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: a possible relationship between host origin and virulence. Mycol Res 107: 567-571.
14. Nghia NA, Kadir J, Sunderasan E, Puad Abdullah M, Malik A, et al. (2008) Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. Mycopathologia 166: 189-201.
15. Dixon LJ, Schlub RL, Pernezny K, Datnoff LE (2009) Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. Phytopathology 99: 1015-1027.
16. Qi Y, Xie Y, Zhang X, Pu J, Zhang H, et al. (2009) Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola*. Mol Biotechnol 41: 145-151.
17. Hieu ND, Nghia NA, Chi VTQ, Dung P (2014) Genetic diversity and pathogenicity of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber trees and other hosts in Vietnam. J Rubber Res 17: 187-203.
18. Shuib SS, Déon M, Mahyuddin MM, Izhar A, Fumanal B, et al. (2015) Cassiicolin genes among *Corynespora* isolates from rubber plantations in Malaysia. Journal of Rubber Research 18: 109-126.
19. Lespinasse D, Rodier-Goud M, Grivet L, Leconte A, Legnate H, et al. (2000a) A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea spp*) based on RFLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. Theor Appl Genet 100: 127-138.
20. Lespinasse D, Grivet L, Troispoux V, Rodier-Goud M, Pinard F, et al. (2000b) Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. Theoretical and Applied Genetics 100: 975-984.

21. Le Guen V, Guyot J, Mattos CRR, Seguin M, Garcia D (2008) Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. *Crop protection* 27: 1498-1503.
22. Le Guen V, Garcia D, Doaré F, Mattos CR, Condina V, et al. (2011) A rubber tree's durable resistance to *Microcyclus ulei* is conferred by a qualitative gene and a major quantitative resistance factor. *Tree Genetics & Genomes* 7: 877-889.
23. Le Guen V, Garcia D, Mattos C, Fouet O, Doaré F, et al. (2013) A newly identified locus controls complete resistance to *Microcyclus ulei* in the Fx2784 rubber clone. *Tree Genetics & Genomes* 9: 805-812.
24. Jayasinghe CK (2000) *Corynespora* leaf fall: the most challenging rubber disease in Asian and African continents. *Bulletin of the Rubber Research Institute of Sri Lanka* 42: 56-64.
25. Manju MJ, Vinod KK, Idicula SP, Kuruvilla J, Nazeer MA, et al. (2010) Susceptibility of *Hevea brasiliensis* clones to *Corynespora* Leaf Fall disease. *J Mycol Pl Pathol* 40: 603-609.
26. Fernando THPS, Jayasinghe CK, Wijesundera RLC, Silva WPK, Nishantha EADN (2010) Evaluation of screening methods against *Corynespora* leaf fall disease of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Journal of Plant Diseases and Protection* 117: 24-29.
27. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. . In: Innis M, Gelfand D, Shinsky J, White T, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press. pp. 315–322. .
28. Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J (1996) NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany* 78: 389-398.
29. Herbette S, Menn AL, Rousselle P, Ameglio T, Faltin Z, et al. (2005) Modification of photosynthetic regulation in tomato overexpressing glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1724: 108-118.
30. Mai J, Herbette S, Vandame M, Kositsup B, Kasemsap P, et al. (2009) Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* Muell. *Arg. Trees - Structure and Function* 23: 863-874.
31. Hallé F, Martin R (1968) Etude de la croissance rythmique chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) Müll. Arg., (Euphorbiacées, crotonoïdées). *Adansonia* 8: 475-503.
32. Chee KH (1988) Studies on sporulation, pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassicola* on *Hevea* rubber.
33. Seguin M, Rodier-Goud M, Lespinasse D (1997) Mapping SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) facilitated and enhanced by heteroduplex formation and template mixing. *Plant and Animal Genomes V Conference*. San Diego, USA. pp. 66.
34. Le Guen V, Gay C, Xiong TC, Souza LM, Rodier-Goud M, et al. (2011) Development and characterization of 296 new polymorphic microsatellite markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Breeding* 130: 294-296.
35. Cubry P, Pujade-Renaud V, Garcia D, Espeout S, Guen VI, et al. (2014) Development and characterization of a new set of 164 polymorphic EST-SSR markers for diversity

- and breeding studies in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.). Plant Breeding 133: 419-426.
36. Risterucci AM, Grivet L, N'Goran JAK, Pieretti I, Flament M-H, et al. (2000) A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. Theor Appl Genet 101: 948-955.
 37. Van Ooijen JW (2006) JoinMap 4, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Wageningen, Netherlands: Kyazma, B V.
 38. Stam P (1993) Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. The Plant Journal 3: 739-744.
 39. Van Ooijen JW (2009) MapQTL 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species Wageningen, Netherlands: Kyazma, B V.
 40. Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138: 963-971.
 41. Morton NE (1955) Sequential tests for the detection of linkage. Am J Hum Genet 7: 277-318.
 42. Lander ES, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185-199.
 43. Jansen RC (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. Genetics 135: 205-211.
 44. Jansen RC, Stam P (1994) High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics 136: 1447-1455.
 45. Déon M, Scomparin A, Tixier A, Mattos C, Leroy T, et al. (2012b) First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. Fungal Diversity 54: 87-99.
 46. Ritter E, Gebhardt C, Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. Genetics 125: 645-654.
 47. Jayasinghe CK (2002) Corynespora leaf fall and future of the leading rubber clones in the world. Bulletin of the Rubber Research Institute of Sri Lanka: 5-11.
 48. Rattanawong R, Teerawatanasuk K, Prapan K, Kasemsap P, Clément-Demange A, et al. Application of QTL mapping for early selection on growth and latex yield traits in rubber breeding; 2011 14-17 December Chiang Mai, Thailand.
 49. Liu Z, Holmes DJ, Faris JD, Chao S, Brueggeman RS, et al. (2015) Necrotrophic effector-triggered susceptibility (NETS) underlies the barley-*Pyrenophora teres* f. *teres* interaction specific to chromosome 6H. Mol Plant Pathol 16: 188-200.
 50. Gao Y, Faris JD, Liu Z, Kim YM, Syme RA, et al. (2015) Identification and Characterization of the SnTox6-Snn6 Interaction in the *Parastagonospora nodorum*-Wheat Pathosystem. Mol Plant Microbe Interact 28: 615-625.
 51. Wen C, Mao A, Dong C, Liu H, Yu S, et al. (2015) Fine genetic mapping of target leaf spot resistance gene cca-3 in cucumber, *Cucumis sativus* L. Theoretical and Applied Genetics 128: 2495-2506.
 52. Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444: 323-329.

53. De Wit PJGM, Mehrabi R, Van Den Burg HA, Stergiopoulos I (2009) Fungal effector proteins: past, present and future. *Mol Plant Pathol* 10: 735-747.
54. Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ (2013) Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341: 746-751.
55. Zipfel C (2014) Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol* 35: 345-351.
56. Keller H, Boyer L, Abad P (2016) Disease susceptibility in the Zig-Zag model of host-microbe interactions: only a consequence of immune suppression? *Mol Plant Pathol* 17: 475-479.
57. Heil M, Land WG (2014) Danger signals - damaged-self recognition across the tree of life. *Front Plant Sci* 5: 578.
58. Friesen TL, Meinhardt SW, Faris JD (2007) The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner. *Plant J* 51: 681-692.
59. Lorang JM, Sweat TA, Wolpert TJ (2007) Plant disease susceptibility conferred by a "resistance" gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14861-14866.
60. Sweat TA, Wolpert TJ (2007) Thioredoxin h5 is required for victorin sensitivity mediated by a CC-NBS-LRR gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 673-687.
61. Nagy ED, Bennetzen JL (2008) Pathogen corruption and site-directed recombination at a plant disease resistance gene cluster. *Genome Res* 18: 1918-1923.
62. Faris JD, Zhang Z, Lu H, Lu S, Reddy L, et al. (2010) A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13544-13549.
63. Cesari S, Thilliez G, Ribot C, Chalvon V, Michel C, et al. (2013) The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *Plant Cell* 25: 1463-1481.
64. Walton JD (2006) HC-toxin. *Phytochemistry* 67: 1406-1413.
65. Kim J, Lim CJ, Lee BW, Choi JP, Oh SK, et al. (2012) A genome-wide comparison of NB-LRR type of resistance gene analogs (RGA) in the plant kingdom. *Mol Cells* 33: 385-392.
66. Yang L, Li D, Li Y, Gu X, Huang S, et al. (2013) A 1,681-locus consensus genetic map of cultivated cucumber including 67 NB-LRR resistance gene homolog and ten gene loci. *BMC Plant Biol* 13: 53.
67. Perazzolli M, Malacarne G, Baldo A, Righetti L, Bailey A, et al. (2014) Characterization of resistance gene analogues (RGAs) in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and their evolutionary history of the rosaceae family. *PLoS ONE* 9: e83844.
68. Chen JY, Huang JQ, Li NY, Ma XF, Wang JL, et al. (2015) Genome-wide analysis of the gene families of resistance gene analogues in cotton and their response to Verticillium wilt. *BMC Plant Biol* 15: 148.
69. Le Guen V, Lespinasse D, Oliver G, Rodier-Goud M, Pinard F, et al. (2003) Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. *Theor Appl Genet* 108: 160-167.

Supporting Information



S1 Fig. Distribution of the EL% data for 18 clones depending on toxin concentration.

The clones were treated with the purified toxin Cas1 at 1, 5 and 10 ng/μL (Tox1, Tox5, Tox10 respectively), the CCP filtrate from which Cas1 was extracted, as well as two blank treatments, water (Tox0) and the culture medium Cz. Top letters indicate the significance of differences between treatments (SNK test, risk $\alpha=0.05$).

Abstract

Hevea brasiliensis is the only commercial source of natural rubber. The CLF (*Corynespora* Leaf Fall) disease caused by the fungus *Corynespora cassiicola* is an important foliar pathology of the rubber tree in Asia and Africa. The disease progression is related with the development of new highly sensitive clonal varieties. A phenotyping method based on the measurement of electrolyte leakage in response to *C. cassiicola* exudates (culture filtrates or purified toxin) was developed and characterized. This test, without direct contact with the fungus itself, can be implemented without risk for plantations. After application of exudate samples on detached leaflets, conductivity is measured before (C1) and after (C2) autoclaving, and the percentage of electrolyte leakage $\%FE=100 \times C1/C2$ is calculated. The influence of different factors such as leaf stage or the duration of incubation has been clarified. A positive correlation was found between the responses to the toxin test and to conidial inoculation. The pertinence of C1 correction by C2 was analyzed.

Two toxin test studies have been carried out for a set of rubber clones, in France, with potted plants in greenhouse, and also in Ivory Coast, under the conditions normally considered for this test, with leaflets from budwood gardens. Repeatability between these two experiments was not perfect but nevertheless satisfying. The $\%FE$ character was found more sensitive and accurate than surface necrosis (SN) measurement. A significant variability in clone susceptibility and treatment virulence was observed, with clone x treatment interactions. The genetic determinism of sensitivity to *C. cassiicola* exudates was analyzed using the toxin test, by QTL detection on two populations of the biparental rubber family PB260 x RRIM600, in two field trials in Ivory Coast. A genetic map was previously built, using 308 SSR markers. Phenotyping of the two progeny populations revealed a polygenic determinism, without major monolocus effect. Over all the fungal exudates, 13 QTL distributed over 10 different linkage groups were identified, with percentages of explanation R^2 varying from 10 to 20 %. On both sites, two QTL have been identified jointly for both the culture filtrate CCP and the toxin Cas1 purified from CCP. Positive correlations have been observed between some of the filtrates, with similar response profiles and common QTL.

The toxin test could usefully replace the conidial inoculation method. However, the value of the test for predicting rubber clones susceptibility to the CLF disease in field conditions remains to be better characterized. Better understanding of the epidemiology of the *H. brasiliensis* x *C. cassiicola* pathosystem would contribute to the breeding objective, and more broadly to the design of control or avoidance methods.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, CLF, toxic test, fungal effector, culture filtrate, cassicolin, electrolyte leakage, fungal exudate, genetic mapping, effector, SSR, QTL.

Résumé

Hevea brasiliensis est la seule source commerciale du caoutchouc naturel. La maladie CLF (*Corynespora* Leaf Fall) provoquée par le champignon *Corynespora cassiicola* est une pathologie foliaire de l'hévéa importante en Asie et en Afrique. Les épidémies sont liées au développement de nouvelles variétés clonales très sensibles. Une méthode conductimétrique de phénotypage de la réponse de l'hévéa aux exsudats de *C. cassiicola* (filtrats de culture ou toxine purifiée) a été développée et caractérisée. Ce test toxinique, sans contact direct avec le champignon lui-même, peut être mis en œuvre sans risque sur les plantations. Après application de gouttes d'exsudats sur des folioles détachées d'un génotype d'hévéa, deux mesures de conductivité C1 et C2 sont réalisées avant et après autoclavage, et le pourcentage de fuite d'électrolyte dû au traitement, $\%FE = 100 \times C1/C2$, est calculé. L'influence de différents facteurs tels que le stade foliaire et la durée d'incubation, a été précisée. Une corrélation positive a été trouvée entre les réponses au test toxinique et à l'inoculation par des conidies du champignon. La pertinence de la correction de C1 par C2 a été analysée.

Deux études du test toxinique ont été réalisées pour une série de clones d'hévéa, d'une part en France avec des plantes en pots cultivées en serre, et d'autre part en Côte d'Ivoire, dans les conditions normalement envisagées pour ce test, avec des folioles provenant de jardins à bois de greffe. La répétabilité entre ces deux études est imparfaite mais néanmoins satisfaisante. Le critère $\%FE$ est apparu plus sensible et plus précis que la mesure de la surface de nécrose induite (SN). Une variabilité importante de la sensibilité des clones et de l'agressivité des exsudats a été observée, avec l'existence d'interactions. L'analyse du déterminisme génétique de la réponse au test toxinique a été menée par détection de QTL sur deux populations de la famille biparentale d'hévéa PB260 x RRIM600, analysées sur deux sites en Côte d'Ivoire. Une carte génétique a été construite au préalable avec 308 marqueurs SSR. Le phénotypage des deux populations a révélé un déterminisme polygénique, sans effet monolocus majeur, avec, pour l'ensemble des exsudats fongiques étudiés, 13 QTL répartis sur 10 groupes de liaison et présentant des pourcentages d'explication R^2 variant de 10 à 20 %. Sur les deux sites, deux QTL ont été identifiés conjointement pour le filtrat CCP et pour la toxine Cas1 purifiée à partir du filtrat CCP, démontrant l'importance de Cas1 pour la toxicité de ce filtrat. Des corrélations positives entre certains filtrats ont été observées, avec des profils de réponse similaires et des QTL communs.

Le test toxinique pourrait remplacer avantageusement la méthode d'inoculation conidienne. Cependant, la valeur prédictive du test pour la sensibilité des clones d'hévéa à la maladie CLF en plantation reste à caractériser. Une meilleure connaissance de l'épidémiologie du pathosystème *H. brasiliensis* x *C. cassiicola* contribuerait à l'objectif de sélection, et plus largement à la conception de méthodes de lutte ou d'évitement.

Mots clés : *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, CLF, test toxinique, exsudat fongique, effecteur, filtrat de culture, cassiicoline, fuite d'électrolytes, cartographie génétique, SSR, QTL.